



# Estudo de marcadores genéticos com interesse forense

Ana João Rocha Fernandes

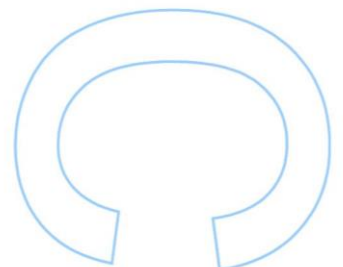
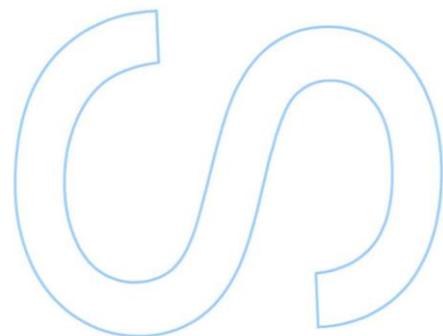
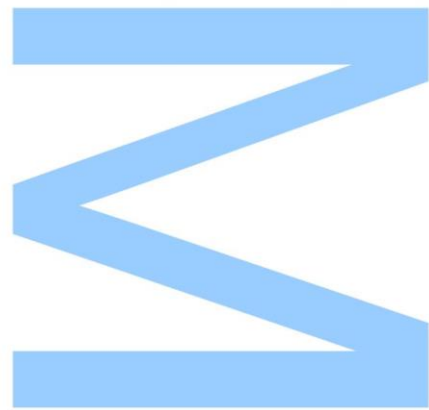
Mestrado em Genética Forense  
Departamento de Biologia  
2016

## **Orientador**

Professora Doutora Maria de Lurdes Pontes Rebelo,  
Departamento de Genética e Biologia Forenses, Instituto de  
Medicina Legal e Ciências Forenses da Delegação do Norte  
(INMLCF) e Professora Externa do Instituto de Ciências  
Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS)

## **Coorientador**

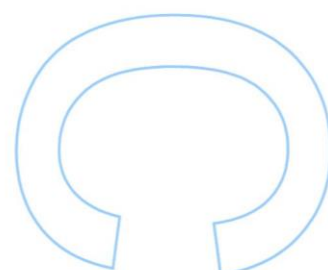
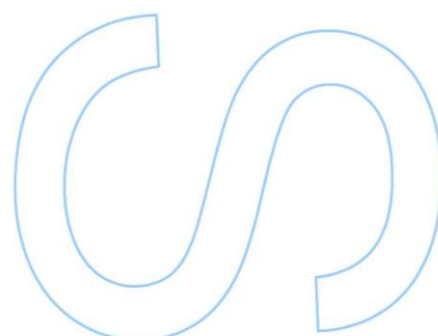
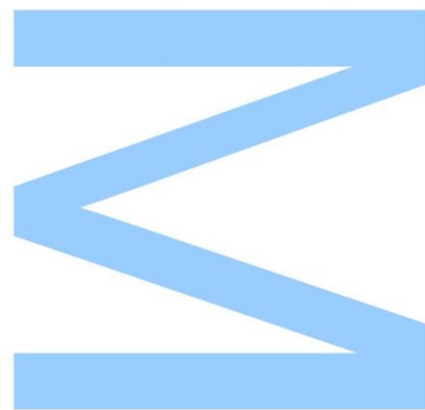
Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Silva Melo,  
Professor Associado Convidado com Agregação, Instituto de  
Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto  
(ICBAS)





Todas as correções determinadas  
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.  
O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



# Agradecimentos

Começo por agradecer à Professora Doutora Maria de Lurdes Rebelo por toda a dedicação, atenção, paciência, apoio e determinação que demonstrou durante todo este trabalho. Agradeço imenso por toda a confiança que demonstrou em mim e no meu trabalho.

Agradeço ao Professor Doutor Rui Medeiros, pela sua amabilidade na disponibilização de amostras populacionais neste trabalho bem como dos meios necessários para o seu tratamento.

Queria também salientar a importante ajuda fornecida por todas as pessoas que trabalharam comigo no Serviço de Genética e Biologia Forenses do Instituto de Medicina Legal e no Instituto Português de Oncologia e agradecer pela disponibilidade que sempre demonstraram e pela ajuda na concretização deste trabalho.

Agradeço também à Doutora Maria João Porto e ao Professor Doutor António Amorim pela confiança que demonstraram em mim e no meu projeto.

Gostaria também de agradecer aos meus amigos e ao meu namorado, pelo enorme apoio, pela paciência, pela grande amizade e companhia ao longo destes anos letivos. Muito obrigada por todos os grandes momentos que me proporcionaram e que ainda continuem por longos anos.

Por último, agradeço à minha família a paciência e o apoio incondicional, pois sem eles nada disto teria sido possível.

Um grande obrigado a todos que me apoiaram e que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste projeto

# Resumo

Os *STR*, *short tandem repeats*, são a classe de polimorfismos genéticos mais comumente utilizados na área forense, devido à fácil e rápida amplificação por *PCR*, possibilidade de analisar vários *STRs* numa só reação (multiplex), alto poder de discriminação e taxas de mutação relativamente elevadas que lhes confere uma elevada variabilidade. Podem ser estudados nos autossomas e nos cromossomas sexuais. Estes marcadores são utilizados para genotipagem em análises de parentesco e de vestígios, tanto para identificação individual como para estudos populacionais. Para este último, os marcadores de linhagem, como o *DNA* mitocondrial, cromossoma X e Y, têm particular utilidade forense. Eles também são muito úteis para estudar os casos que envolvem amostras degradadas, identificação de restos humanos e casos de violência sexual.

Independentemente dos *STRs* autossómicos serem mais informativos do que Y-*STRs*, o seu estudo ajuda a complementar a informação autossómica. Eles são muito úteis em misturas onde está presente um excesso de *DNA* feminino o que nos permite obter um perfil masculino. No entanto, um *match* entre uma amostra de prova e um suspeito significa que também não estão excluídos familiares aparentados por via paterna (pai, irmãos, filhos, etc.) como fontes potenciais de provas. O seu estudo é também muito importante para inferir histórias da população, descobrir relações genealógicas, para traçar a migração humana e evolução através da linhagem masculina.

Este trabalho tem como principal objetivo o estudo dos marcadores atrás referidos, utilizando amostras de indivíduos imigrantes da Europa de Leste a residir em Portugal (n=27) e amostras de indivíduos de uma população de angolanos (n=25) para verificar se existem algumas semelhanças/diferenças entre estas populações e a população Portuguesa (amostras de indivíduos do Norte de Portugal).

Em conclusão, com este trabalho queremos mostrar que continua pertinente a aplicação dos *STRs*, concretamente dos Y-*STR* na área forense, principalmente em grupos populacionais menos estudados. Como complemento pretende-se também obter alguma informação de ancestralidade a partir de alguns marcadores *STR* autossómicos estudados nas mesmas amostras.

**Palavras-chave:** Cromossoma Y, *STRs*, Y-*STRs*, imigrantes da Europa de Leste, população angolana, população portuguesa.

# Abstract

Short tandem repeats (STR) are the class of genetic polymorphisms most commonly used in forensic due to easy and rapid PCR amplification, ability to analyze many STRs in one reaction (multiplex), high discrimination power and relatively high mutation rates which confers them a high variability. They can be studied both in autosomes and in sex chromosomes. These markers are used in kinship genotyping and trace analysis, both for individual identification and for population studies. For this last purpose lineage markers, such as mitochondrial DNA, chromosome X and Y markers, have particular forensic utility. They are also very useful to study cases that involve degraded samples, human remains identification and sexual assault cases.

Regardless of autosomal STRs are much more informative than Y- STRs, their study helps to supplement the autosomal information. They are very useful in mixtures where excess female DNA is present allowing us to get a male profile. However a match between an evidentiary sample and a suspect means that male relatives (father, brothers, sons, etc.) are also not excluded as potential sources of the evidence. They are also highly helpful tools to infer population histories, discover genealogical relationships, for tracing human migration and evolution through male lineage.

This work aimed to study the markers referred above, using a sample of east Europe immigrant individuals ( $n = 27$ ) and a sample of individuals from a population of Angola ( $n = 25$ ) to check if there are some similarities between then and the Portuguese population (North of Portugal).

In conclusion, with this work we want to show that remains relevant the application of STRs in forensic, especially in population witch the study is not very deepen. It is intended also to get some information of ancestry from autosomal STR studied in the same sample.

**Keywords:** Y chromosome, STRs, Y-STRs, Eastern European immigrants, Angolan population, Portuguese population.

# Índice

<b>Agradecimentos.....</b>	<b>iv</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>v</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1. Cromossoma Y.....	1
1.2. Marcadores do cromossoma Y usados em Forense.....	6
1.2.1. STRs.....	7
1.2.2. Y-STRs .....	8
1.3. Populações em estudo.....	10
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>12</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>13</b>
3.1. Extração.....	13
3.2. Quantificação .....	13
3.3. PCR .....	14
3.4. Tipagem .....	17
3.5. Análise estatística .....	17
<b>4. Resultados .....</b>	<b>18</b>
4.1. Análise estatística dos dados obtidos pelos <i>STRs</i> autossómicos com recurso ao <i>software Arlequin</i> .....	18
4.2. Análise estatística dos dados obtidos pelos <i>Y-STRs</i> com recurso ao <i>software Arlequin</i> .....	20
4.3. Análise estatística dos dados obtidos pelos <i>STRs</i> autossómicos com recurso ao <i>software Structure</i> .....	22
<b>5. Discussão.....</b>	<b>24</b>
<b>6. Conclusões .....</b>	<b>31</b>
<b>7. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>33</b>
<b>8. Anexos.....</b>	<b>38</b>

# Índice de tabelas

<b>Tabela 1</b> - As três classes de sequências eucromáticas (transpostas do X, degeneradas do X e amplicónicas).....	4
<b>Tabela 2</b> - Populações e o número de indivíduos amostrados.....	13
<b>Tabela 3</b> - Heterozigosidade observada após a análise dos <i>STR</i> autossómicos de Angola e Ucrânia .....	18
<b>Tabela 4</b> - Distância genética $F_{st}$ após a análise dos <i>STRs</i> autossómicos de Angola e Ucrânia, utilizando o método de distância: <i>pairwise differences</i> .....	19
<b>Tabela 5</b> - Matriz de valores significativos $F_{st}$ após a análise dos <i>STRs</i> autossómicos de Angola e Ucrânia .....	19
<b>Tabela 6</b> - Heterozigosidade observada após a análise dos Y- <i>STRs</i> das três populações em estudo.....	20
<b>Tabela 7</b> - Distância genética $F_{st}$ após a análise dos Y- <i>STRs</i> das três populações em estudo, utilizando o método de distância: <i>pairwise differences</i> .....	21
<b>Tabela 8</b> - Média das diferenças entre as três populações em estudo após a análise dos Y- <i>STRs</i> , utilizando o método de distância: <i>pairwise differences</i> .....	21
<b>Tabela 9</b> - Matriz de valores significativos $F_{st}$ após a análise dos Y- <i>STRs</i> das três populações em estudo.....	21

# Índice de figuras

<b>Fig. 1</b> - Esquema do cromossoma Y humano.....	2
<b>Fig. 2</b> - Representação de um mapa de Angola e parte da Europa, com a distribuição geográfica das três populações em estudo.....	10
<b>Fig. 3</b> - Tabela de locus e alelos incluídos no ladder dos microssatélites presentes no <i>AmpFISTR™ Identifiler™ Plus Kit</i> . ....	14
<b>Fig. 4</b> - Tabela de locus e alelos incluídos no ladder dos microssatélites presentes no <i>AmpFISTR™ Yfiler™ Kit</i> . ....	15
<b>Fig. 5</b> - Tabela de locus e alelos incluídos no ladder dos microssatélites presentes no <i>Investigator™ Argus Y-12 QS Kit</i> .....	16
<b>Fig. 6</b> - Gráfico “ <i>Barplot of estimates of Q</i> ” dos <i>STRs</i> autossómicos .....	23
<b>Fig. 7</b> - Alelo duplicado no locus DYS437 e no DYS391 numa amostra que provêm da amostra populacional Ucrânia, após análise dos Y- <i>STRs</i> .....	26
<b>Fig. 8</b> - Alelo que não está incluído no <i>ladder</i> do <i>kit</i> , presente no locus DYS458, observados numa das amostras da população Ucrânia, após análise dos Y- <i>STRs</i> , possivelmente corresponde ao alelo 22.....	27
<b>Fig. 9</b> - Alelo que não está incluído no <i>ladder</i> do <i>kit</i> , presente no locus DYS456, observados numa das amostras da população Ucrânia, após análise dos Y- <i>STRs</i> , possivelmente corresponde ao alelo 12.....	27
<b>Fig. 10</b> – Eletroforetogramas referentes aos loci DYS448 e DYS385, após a análise Y- <i>STRs</i> da amostra populacional Ucrânia, onde não se detetam fragmentos, correspondendo a possíveis alelos nulos.....	28



# Abreviaturas

**DNA:** *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

**ECG:** Eletroforetogramas

**Kb:** Quilo par de bases

**Mb:** Mega par de bases

**PAR:** Região pseudo-autossómica

**PAR1:** Região pseudo-autossómica 1

**PAR2:** Região pseudo-autossómica 2

**PAR3:** Região pseudo-autossómica 3

**PBS:** Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato-salino)

**PCR:** *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

**Ng:** Nanograma

**MSY:** *Male-specific region* (Região específica do cromossoma Y)

**RM Y-STR:** *Rapidly mutating Y-STR*

**SNP:** *Single nucleotide polymorphism*

**STR:** *Short tandem repeat*

**SRY:** *Sex-determining region Y* (região do Y determinante do sexo)

**TDF:** *Testis-determining factor*

**Xq21:** Banda 21 localizada no braço longo do cromossoma X

**YHRD:** *Y-Chromosome STR Haplotype Reference Database*

**Y-STR:** STR associado ao cromossoma Y

**Yp:** Braço curto do cromossoma Y

**Yq:** Braço longo do cromossoma Y

# 1. Introdução

## 1.1. Cromossoma Y

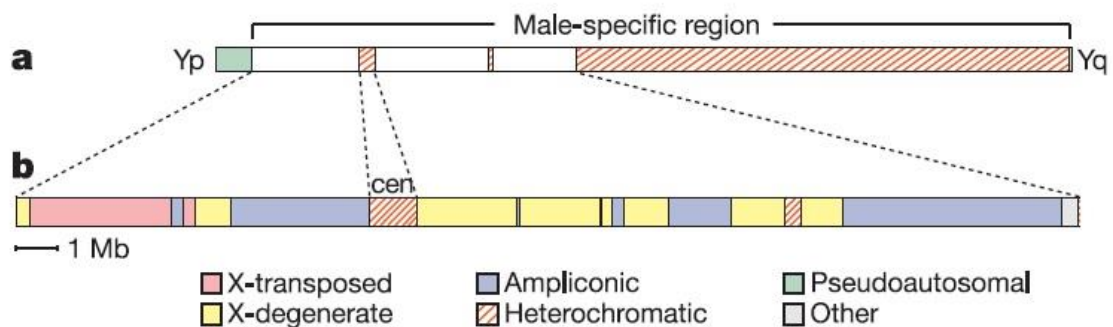
Há aproximadamente 300 milhões de anos, a partir de um par de cromossomas homólogos, ocorreram os primeiros passos evolutivos que conduziram à diferenciação dos atuais cromossomas sexuais, X e Y [1-3]. Subsequentemente houve rearranjos no cromossoma Y provocados por inversões e sucessivas deleções, restringindo a recombinação entre grandes porções dos cromossomas Y e X. Este acontecimento acabou por conduzir a um encurtamento gradual do cromossoma Y [4, 5].

O cromossoma Y humano, segundo cromossoma humano mais pequeno, é composto por 60Mb contendo apenas 78 genes [6]. O gene *SRY* (*sex-determining region Y*) localizado neste cromossoma codifica uma proteína *TDF* (*testis-determining factor*) responsável por desencadear o desenvolvimento dos testículos e por determinar o sexo do feto através de uma cascata hormonal. Mutações neste gene podem levar à formação de mulheres XY (síndrome de Swyer) e a translocação deste gene para um cromossoma X, pode levar à formação de homens XX (síndrome De La Chapelle) [2, 6].

Trata-se de um cromossoma que é composto por três regiões, duas regiões pseudo-autossómicas (*PAR*) e uma região específica do cromossoma Y (*MSY*). As regiões *PAR1*, localizada na parte mais distal do braço curto, e *PAR2*, localizada na parte distal do braço longo, emparelham com regiões específicas localizadas no cromossoma X durante a meiose masculina, havendo recombinação entre ambos [1, 6, 7]. Durante a meiose, no sexo feminino, os cromossomas emparelham como os autossomas. No sexo masculino o emparelhamento acontece através de *PAR1* e *PAR2*, apesar de os cromossomas Y e X serem muito diferentes em tamanho e conteúdo [7]. A boa segregação no sexo masculino é então assegurada por este emparelhamento, sendo que pelo menos a ocorrência de uma recombinação é essencial para a segregação masculina. Durante o emparelhamento destas regiões ocorre *crossing-over* obrigatório. A frequência de recombinação nestas regiões atinge os 28%, dez vezes mais do que o normal numa região com o seu tamanho (2.6Mb em *PAR1*). Na região *PAR2* (330Kb) a recombinação também ocorre, mas não tão frequentemente quanto *PAR1*, uma vez que não é necessária, nem suficiente para que ocorra meiose masculina. Estudos prévios demonstraram que existem outras regiões, além destas regiões pseudo-autossómicas, onde existe recombinação [1, 8, 9].

Assim, a maior parte do cromossoma Y, excluindo as regiões *PAR*, não participa na recombinação meiótica, permitindo a passagem inalterada da herança genética de pais para filhos, salvo a ocorrência de mutações [6, 7, 10]. Para além disso, a falta de recombinação pode ser a razão do porquê do cromossoma Y ter tão poucos genes, a falta de *crossing-over* faz com que as mutações nestes genes tenham poucas possibilidades de serem reparadas e muitas possibilidades de passar para a próxima geração. Por esta razão, a análise do cromossoma Y é importante na investigação forense, para rastrear a evolução das linhagens masculinas e em estudos populacionais [4, 6, 10-13].

Dos 60Mb que constituem o cromossoma Y, até ao presente, apenas foram estudados cerca de 23Mb [1]. Cerca de 30Mb é uma região heterocromática, localizada no braço longo do cromossoma Y, sendo composta por sequências altamente repetitivas, as quais, até ao momento, têm sido impossíveis de sequenciar com a tecnologia existente. Uma característica deste cromossoma é que possui muitas sequências duplicadas, duplicações estas que terão surgido, quer a partir do próprio cromossoma Y, quer a partir do cromossoma X [1]. Três classes de sequências foram identificadas no cromossoma Y: transpostas do X, degeneradas do X e amplicónicas [1, 9].



**Fig. 1** - Esquema do cromossoma Y humano. (a) Esquema representativo de todo o cromossoma Y, em que estão indicadas as regiões *PAR1* no Yp e *PAR2* no Yq, região heterocromática e a *MSY*. (b) Esquema detalhado de *MSY* em que destaca as três classes de sequências eucromáticas (transpostas do X, degeneradas do X e amplicónicas). Fonte: [1].

Dos blocos localizados no braço curto do cromossoma Y com um comprimento combinado 3.4Mb metade são sequências transpostas do X. Estas sequências são 99% idênticas a sequências localizadas em Xq21, contêm dois genes codificantes e não participam no *crossing-over* X-Y durante a meiose masculina [1, 4, 9, 14].

As sequências degeneradas do X, são específicas do sexo masculino, e encontram-se em oito blocos ao longo dos braços curto e longo do cromossoma Y, com um comprimento total de 8.6Mb. Estes segmentos possuem cerca de 96% de homologia sendo que estas regiões podem causar problemas quando se projetam novos ensaios no cromossoma Y de modo a garantir a obtenção de resultados específicos do sexo masculino [1, 4, 9, 14].

Os segmentos amplicónicos são compostos por sete blocos dispersos pelos braços longo e curto do cromossoma Y cobrindo um total de 10.2Mb. Cerca de 60% destas sequências têm identidade intracromossómica de 99.9% ou mais. Isto torna difícil a distinção das diferentes sequências (umas das outras). Outra característica importante reside no facto de muitas destas sequências serem palindrómicas, isto é, sequências duplicadas em espelho. Oito desses palíndromas em conjunto perfazem 5.7Mb e situam-se no braço longo do cromossoma Y. Pelo menos seis dessas sequências contêm genes testiculares. Marcadores genéticos nestas regiões irão produzir multi-cópias de produtos de *PCR* a partir de um único par de *primers* [1, 4, 5, 9, 14-16].

**Tabela 1** - As três classes de sequências eucromáticas (transpostas do X, degeneradas do X e amplicónicas). Esquema de cores como na **figura 1**. Fonte: Adaptado [1].

Sequências	Características definidoras	Origens evolutivas	Distribuição	Comprimento total (Mb)
<b>Transpostas do X</b>	99 % de identidade com X	Única transposição do X	2 blocos em Yp	3.4
<b>Degeneradas do X</b>	Gene ou pseudogene homólogos de cópia única de genes ligados ao X	Relíquias de autossomas antigos, desde a evolução do X e Y	8 blocos em Yp e Yq	8.6
<b>Amplicónicas</b>	Pequena semelhança com outras sequências de MSY	Adquirido a partir de diversas fontes, amplificadas posteriormente	7 blocos em Yp e Yq	10.2

O cromossoma Y é muito sensível à estruturação populacional (seleção e deriva) podendo constituir uma vantagem e, simultaneamente, uma desvantagem deste cromossoma [6, 12, 17]. Das inúmeras vantagens do cromossoma Y além da haploidia que nos permite a genotipagem direta, a transmissão do cromossoma Y de pai para os seus filhos permite que se possam usar amostras de outros membros da família (ligados sempre por via paterna) para estabelecer linhagens e paternidades [12, 14]. Outra vantagem reside na possibilidade de os marcadores específicos do cromossoma Y poderem ser amplificados seletivamente a partir de misturas, de células masculinas e femininas, onde existam elevados níveis de *DNA* do contribuidor feminino (como é frequente acontecer nos casos de violação e análise de *DNA* fetal no plasma materno) [18-22]. Finalmente, outra vantagem consiste na existência de *kits Y-STR standard* que permitem que haja cruzamento da informação que consta das bases de dados no cromossoma Y de países distintos [19]. Atualmente, a quase totalidade das bases de dados de cromossoma Y existentes, incluem apenas haplótipos com *Y-STRs*.

Por outro lado, uma vez que os parentes por via paterna partilham o mesmo cromossoma Y, a tipagem *Y-STR* não nos permite uma diferenciação individual, o que demonstra que os marcadores do cromossoma Y não são tão informativos como os marcadores autossómicos [19-21]. Outra desvantagem do cromossoma Y é que como

os seus *loci* não são independentes, as probabilidades de *matching* não podem ser obtidas pela regra do produto. Para isso devem ser usados os haplótipos (combinação dos alelos observados em todos os *loci* testados) [19]. Além da dificuldade de realizar a sua sequenciação uma vez que é rico em cópias repetidas e inversões, as duplicações e deleções podem dificultar a análise do cromossoma Y [1].

Alguns indícios de como o cromossoma Y terá evoluído podem ser encontrados ao comparar genes e sequências nos cromossomas Y e X, bem como ao comparar genes homólogos em espécies diferentes [3, 16]. A análise das diferenças encontradas em genes homólogos de espécies diferentes trata-se de um método usado para estimar o tempo evolutivo. Todas as sequências genéticas acumulam mutações ao longo do tempo, pelo que espécies evolutivamente mais distantes irão possuir mais diferenças no seu *DNA* do que as espécies mais próximas [1, 3, 5].

Uma vez que não ocorre recombinação entre grande parte das sequências dos cromossomas Y e X, os genes localizados nessas regiões começaram a evoluir separadamente. Aparentemente isto terá acontecido por etapas, pois existem genes nestas regiões que estão mais relacionados que outros, sugerindo que a recombinação entre eles terá parado mais recentemente nuns que nos outros. Para além disto, outros eventos como inversões, também terão estado envolvidos no final da recombinação [1, 3-5].

## 1.2. Marcadores do cromossoma Y usados em Forense

Os marcadores de linhagem compreendem os polimorfismos do cromossoma Y, herdado por via paterna. A análise destes marcadores é limitada na maior parte dos casos forenses, uma vez que como foi referido, estes não possuem o mesmo poder de discriminação que os marcadores autossómicos [7, 19-21, 23, 24]. Ainda assim, existem algumas características que os tornam interessantes sob o ponto de vista forense, como a análise de evidências forenses que envolvem misturas de células femininas e masculinas, testes de paternidade, e outro tipo de estudos como investigações históricas, estudos de padrões de migração humana e estudo de genealogias [7, 25, 26].

Existem duas grandes categorias de marcadores de *DNA* usados para estudar a diversidade do cromossoma Y: os *loci* bi-alélicos e os *loci* multi-alélicos.

Os resultados obtidos a partir dos marcadores bi-alélicos permitem obter informação sobre os haplogrupos, enquanto os multi-alélicos permitem-nos obter dados haplótipos [6, 12].

Os marcadores bi-alélicos incluem os *SNPs* e elementos *Alu*, e são considerados eventos polimórficos únicos devido à sua baixa taxa de mutação ( $\approx 10^{-8}$  a  $10^{-9}$  por geração) [6, 26, 27]. Já os marcadores multi-alélicos incluem 2 minissatélites e várias centenas de *STRs* que permitem diferenciar haplótipos do cromossoma Y com maior resolução que os anteriores, pois possuem taxas de mutação mais elevadas (1 em 10-3) [13, 27, 28]. Estes últimos marcadores são os mais utilizados para fins forenses.



### 1.2.1. STRs

Os *STR*, *short tandem repeats*, atualmente são os marcadores genéticos mais utilizados na área forense devido à fácil e rápida amplificação por *PCR*, à possibilidade de analisar vários *STRs* numa só reação (multiplex), ao elevado grau de variabilidade na população, ao elevado poder de discriminação, às elevadas taxas de mutação e à facilidade de interpretação dos resultados [23, 29-31]. Podem ser estudados quer nos autossomas quer nos cromossomas sexuais [20, 31].

Estes marcadores são usados para genotipagem em análises de parentesco e de vestígios criminais, tanto para identificação individual como para estudos populacionais. Quanto a estes últimos estudos, os marcadores de linhagem, como o *DNA* mitocondrial, e a análise dos cromossomas X e Y, têm particular utilidade forense [20, 21, 28, 30, 32, 33].

Também são muito úteis para o estudo de casos que envolvam amostras degradadas, identificação de restos humanos e casos de agressão sexual [7, 13, 20, 30].

### 1.2.2. Y-STRs

Os Y-STRs constituem uma ferramenta muito poderosa tanto a nível forense como a nível de estudo evolutivos. Localizam-se na parte não recombinante do cromossoma Y, estão representados apenas em indivíduos do sexo masculino como alelos únicos intimamente ligados na linhagem masculina de uma família, ou seja, apresentam uma herança haplóide e uniparental paterna, inalteráveis salvo mutação [7, 20, 21, 23, 24]. Apesar dos Y-STRs serem muito menos informativos do que os STRs autossómicos, o seu estudo ajuda a complementar a informação obtida a partir dos autossomas [19-21].

Estes marcadores são muito úteis na análise de misturas onde existe um excesso de DNA feminino relativamente ao DNA masculino, permitindo obter-se um perfil masculino [18-22, 33]. No entanto, um *match* entre uma amostra de crime e um suspeito não permite excluir indivíduos aparentados por via paterna, (pai, irmãos, filhos, etc.), como potenciais suspeitos [19-21].

Também é possível, através da análise do DNA de parentes de via paterna, proceder a testes de paternidade e de testes de identificação de pessoas desaparecidas, sendo uma ferramenta bastante útil [13, 20, 22, 33, 34].

Como também já foi referido, são ainda marcadores altamente informativos para inferir a história das populações, para descobrir relações genealógicas, para seguir as migrações humanas e a evolução através da linhagem masculina, sendo usados para inferir origens temporais e espaciais de eventos recentes do cromossoma Y, devido à sua elevada taxa de mutação [7, 13, 17, 19, 20, 30, 35].

Dentro dos Y-STRs, existem aqueles que têm sempre a mesma unidade de repetição, os Y-STRs simples, e outros que são compostos por mais do que uma unidade de repetição, Y-STRs compostos. Os marcadores Y-STRs simples multicópia também podem constituir uma alternativa aos marcadores compostos dos Y-STRs devido à relação da taxa de mutação e da variação de comprimento entre ambos, mas, podem causar problemas na dedução correta do número de perfis masculinos que contribuíram para a amostra da cena do crime, relativamente à criminalística [35].

Existem *kits* comerciais que permitem aumentar o poder de discriminação dos Y-STRs em aplicações forenses e evolutivas, permitindo uma maior resolução na avaliação das relações entre populações, desde a origem geográfica até à origem

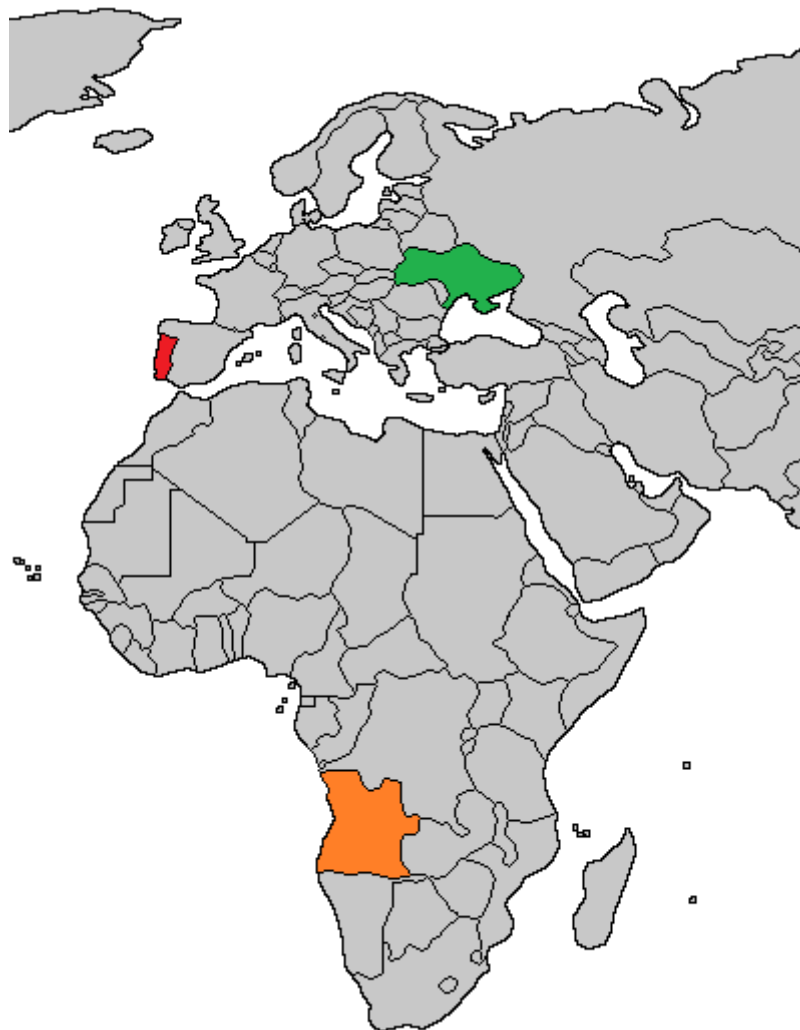
familiar do dador, sempre com uma interpretação correta sobre as propriedades de cada população [19, 34, 36].

Os *kits* comerciais referidos permitem ainda distinguir com segurança perfis masculinos não aparentados por via paterna, mas quando se trata de distinção perfis masculinos aparentados por via paterna ou mesmo distinção do par pai-filho, os Y-STRs habitualmente mais usados começam a não ser suficientes, mesmo sendo altamente polimórficos são necessários marcadores com um maior poder de discriminação comparativamente com os Y-STRs [13, 30, 35, 37].

Para isso os *rapidly mutating Y-STR (RM Y-STR)* começaram a ser introduzidos nos novos *kits* de Y-STRs, sendo conhecidos como o “futuro da análise forense dos Y-STRs”. Além de aumentar o poder de discriminação usando poucos marcadores, estes *kits* permitem a distinção entre familiares por linha paterna, o que com os Y-STRs tradicionalmente usados, não era possível. Estudos para testar a capacidade dos *RM Y-STR* para verificar se é possível a distinção entre pai e filho, já foram feitos mas necessitam de mais dados. Isto acontece devido à elevada taxa de mutação dos marcadores presentes nos *RM Y-STR* [21, 38-40].

### 1.3. Populações em estudo

Foram utilizadas amostras que foram recolhidas de indivíduos pertencentes a populações que habitam em Angola e de indivíduos imigrantes da Europa de Leste que habitam em Portugal. Para as comparações foram utilizados resultados obtidos previamente a partir de indivíduos pertencentes a populações que habitam no Norte de Portugal [41].



**Fig. 2** - Representação de um mapa de Angola e parte da Europa, com a distribuição geográfica das três populações em estudo.

Legenda: Vermelho – Portugal

Verde – Ucrânia

Laranja – Angola

A Angola é um país da costa ocidental Africana, uma ex-colónia portuguesa, que faz fronteira com a República Democrática do Congo, Zâmbia e Namíbia [42, 43]. Devido à sua origem e migração, Angola tem uma vasta gama de relações cruzadas. A nível linguístico, étnico e cultural, os grupos Bakongo, Kimbundo e Ovimbundo representam  $\frac{3}{4}$  da população [44, 45]. Alguns estudos a nível étnico tem sido feitos em relação à população angolana, mas visto que Angola é uma ex-colónia portuguesa, decidimos investigar se ainda existem algumas semelhanças com a população Portuguesa.

A Ucrânia é um país da Europa Oriental, que faz fronteira com a Federação Russa, Bielorrússia, Polónia, Hungria, Eslováquia, Roménia e Moldávia [42]. Hoje em dia a partir do ponto de vista geográfico, cultural e linguístico os Eslavos foram divididos em três subgrupos no qual os ucranianos estão inseridos nos Eslavos Orientais, juntamente com os bielorrussos e com os russos [17].

Visto que o estudo dos Y-STRs na população ucraniana não está muito aprofundado [46] decidimos usar uma amostra destes indivíduos imigrantes da Europa de Leste, para verificar se existem algumas semelhanças entre a população portuguesa e a população ucraniana, visto que os ucranianos são atualmente a segunda maior população de imigrantes a residir em Portugal, representando cerca de 11% da comunidade estrangeira residente em Portugal.

## 2. Objetivos

Com este trabalho queremos mostrar que continua pertinente a aplicação dos *STRs* na área forense, concretamente os marcadores *Y-STRs*, principalmente em grupos populacionais menos estudados. Para o cumprimento deste objetivo geral, definiu-se como objetivos intermédios: a caracterização genética das populações Angola e Ucrânia, a avaliação da diversidade genética e a determinação de outros parâmetros forenses nas mesmas populações.

Pretende-se também obter alguma informação adicional a partir dos marcadores *STR* autossómicos estudados.

Os marcadores autossómicos estudados neste trabalho, habitualmente são usados com fins de identificação humana mas poderão, em alguns casos, fornecer informação adicional com alguma utilidade forense.

### 3. Material e Métodos

Neste trabalho estudaram-se *STRs* autossómicos e *Y-STRs*, utilizando amostras de indivíduos de duas amostras populacionais, uma amostra populacional de Angolanos e uma população de imigrantes do leste europeu constituída por Ucrânicos a residir em Portugal. As nossas populações em estudo foram depois comparadas com uma população do Norte de Portugal, previamente estudada [41].

**Tabela 2** - Populações e o número de indivíduos amostrados.

População	Nº de indivíduos
Ucraniana	27
Angolana	25
Norte de Portugal*	171
<b>Total</b>	<b>223</b>

\*dados populacionais utilizados apenas para comparação.

#### 3.1. Extração

DNA foi extraído a partir de zaragatoas bucais e de cartões *FTA<sup>TM</sup>* usando o método de extração por *Chelex* [47] e a partir de sangue usando um *kit*, o *FavorPrep<sup>TM</sup> Genomic DNA Mini Kit*. Em **anexo 2** e **3**, respetivamente, encontram-se os protocolos pelo método de extração por *Chelex* e o protocolo estandardizados para sangue congelado pelo *FavorPrep<sup>TM</sup> Genomic DNA Mini Kit* que usamos neste trabalho.

#### 3.2. Quantificação

A amostra populacional Angola e a amostra populacional Ucrânia foram quantificadas usando o *Nanodrop<sup>TM</sup> 1000 Spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific*) e o *ABI 7500 Real-time PCR* (*Applied Biosystems*), respetivamente, seguindo as recomendações do fabricante.

Para a análise da amostra populacional Angola, os comprimentos de onda utilizados para a observação foram entre os 260/280nm e dos 260/230nm.

No caso da amostra populacional Ucrânia utilizou-se o *kit Quantifiler Human*, de acordo com as recomendações do fabricante.

Após análise dos resultados da quantificação foi estabelecido a utilização de 1µl a 2µl de amostra dependendo do *kit* de amplificação utilizado de cada população em estudo, uma vez que as concentrações se situavam numa gama recomendada, ou seja, entre 0.5 e 2ng/µl.

### 3.3. PCR

Para este trabalho foram utilizados os *kits* comerciais *AmpFISTR™ Identifiler™ Plus Kit* (Applied Biosystems), *AmpFISTR™ Yfiler™ Kit* (Applied Biosystems) e *Investigator™ Argus Y-12 QS Kit* (Qiagen).

Para a análise dos *STRs* autossómicos de ambas as populações procedemos à amplificação com o *AmpFISTR™ Identifiler™ Plus Kit* (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante, reduzindo o volume final. Os respetivos locus e alelos incluídos no *ladder* fornecido com o *kit*, estão indicados na **figura 3**.

Locus designation	Chromosome location	Alleles included in Allelic Ladder	Dye label	Control DNA 9947A
D8S1179	8	8, 9 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	6-FAM™	13, 13
D21S11	21q11.2-q21	24, 24.2, 25, 26, 27, 28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36, 37, 38		30, 30
D7S820	7q11.21-22	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 11
CSF1PO	5q33.3-34	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		10, 12
D3S1358	3p	12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19	VIC®	14, 15
TH01	11p15.5	4, 5, 6, 7, 8, 9, 9.3, 10, 11, 13.3		8, 9.3
D13S317	13q22-31	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11, 11
D16S539	16q24-qter	5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		11, 12
D2S1338	2q35-37.1	15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	NED™	19, 23
D19S433	19q12-13.1	9, 10, 11, 12, 12.2, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 16.2, 17, 17.2		14, 15
vWA	12p12-pter	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		17, 18
TPOX	2p23-2per	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13		8, 8
D18S51	18q21.3	7, 9, 10, 10.2, 11, 12, 13, 13.2, 14, 14.2, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27	PET®	15, 19
Amelogenin	X: p22.1-22.3; Y: p11.2	X, Y		X
D5S818	5q21-31	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16		11, 11
FGA	4q28	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26.2, 27, 28, 29, 30, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 42.2, 43.2, 44.2, 45.2, 46.2, 47.2, 48.2, 50.2, 51.2		23, 24

**Fig. 3** - Tabela de locus e alelos incluídos no *ladder* dos microssatélites presentes no *AmpFISTR™ Identifiler™ Plus Kit*.  
Fonte: Adaptado de *AmpFISTR™ Identifiler™ Plus PCR Amplification Kit User Guide*.



As amplificações ocorreram na presença de 2.5µl de *Master Mix*, 1.25µl de *Primer Set*, 2.5µl de água desionizada, obtendo um volume total de *Mix* de 6µl, ao qual foi adicionado 1µl de amostra.

Os controlos positivo e negativo fazem parte do *kit* e foram utilizados em cada reação de *PCR*.

As reações de polimerização decorreram da seguinte maneira:

- 95°C durante 11 minutos;
- 28 ciclos a 94°C durante 1 minuto e a 59°C durante 3 minutos;
- 60°C durante 10 minutos.

Para a análise dos Y-STRs foi utilizado o *AmpFISTR™ Yfiler™ Kit* (*Applied Biosystems*), seguindo as instruções do fabricante, reduzindo o volume final, para a análise das amostras da população de imigrantes do leste europeu constituída por Ucrrianos a residir em Portugal. Os respetivos locus e alelos incluídos no *ladder* fornecido com o *kit*, estão indicados na **figura 4**.

Locus designation	Alleles included in AmpFISTR® Yfiler® Allelic Ladder	Dye label	Control DNA 007
DYS456	13, 14, 15, 16, 17, 18	6-FAM™	15
DYS389 I	10, 11, 12, 13, 14, 15		13
DYS390	18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27		24
DYS389 II	24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34		29
DYS458	14, 15, 16, 17, 18, 19, 20	VIC®	17
DYS19	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19		15
DYS385 a/b	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25		11,14
DYS393	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16	NED™	13
DYS391	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13		11
DYS439	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15		12
DYS635	20, 21, 22, 23, 24, 25, 26		24
DYS392	7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18		13
Y GATA H4	8, 9, 10, 11, 12, 13	PET®	13
DYS437	13, 14, 15, 16, 17		15
DYS438	8, 9, 10, 11, 12, 13		12
DYS448	17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24		19

**Fig. 4** - Tabela de locus e alelos incluídos no *ladder* dos microssatélites presentes no *AmpFISTR™ Yfiler™ Kit*.  
Fonte: Adaptado de *AmpFISTR™ Yfiler™ PCR Amplification Kit User Guide*.

As amplificações ocorreram na presença de 2.5µl de *Master Mix*, 1.25µl de *Primer Set*, 2.5µl de água desionizada, obtendo um volume total de *Mix* de 6µl, ao qual foi adicionado 1µl de amostra.

Os controlos positivo e negativo fazem parte do *kit* e foram utilizados em cada reação de *PCR*.

As reações de polimerização decorreram da seguinte maneira:

- 95°C durante 11 minutos;
- 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 61°C durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto;
- 60°C durante 80 minutos.

Para a análise dos Y-STRs das amostras da população de Angolanos foi utilizado o *Investigator™ Argus Y-12 QS Kit (Qiagen)*, seguindo as instruções do fabricante, reduzindo o volume final. Os respetivos locus e alelos incluídos no *ladder* fornecido com o *kit*, estão indicados na **figura 5**.

Locus	Dye label	Repeat numbers of allelic ladder
DYS439	6-FAM	8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,
DYS437	6-FAM	12, 13, 14, 15, 16, 18
DYS390	6-FAM	20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
DYS385	6-FAM	9, 10, 11, 12, 13, 13.2, 14, 15, 15.2, 16, 17, 17.2, 18, 19, 20, 21
DYS391	BTG	8, 9, 10, 11, 12, 13,
DYS389-I	BTG	11, 12, 13, 14, 15
DYS19	BTG	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18
DYS389-II	BTG	27, 28, 29, 30, 31, 32, 33
DYS393	BTY	11, 12, 13, 14, 15, 16
DYS438	BTY	8, 9, 10, 11, 12, 13, 16
DYS392	BTY	7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15

**Fig. 5** - Tabela de locus e alelos incluídos no *ladder* dos microssatélites presentes no *Investigator™ Argus Y-12 QS Kit*.  
Fonte: Adaptado de *Investigator™ Argus Y-12 QS handbook*.

As amplificações ocorreram na presença de 2µl de *Master Mix* (composta por *Primer Set*, *Taq* e *Reaction Mix*), 2µl de água desionizada e 2µl de amostra, obtendo um volume total de 6µl.

Os controlos positivo e negativo fazem parte do *kit* e foram utilizados em cada reação de PCR.

As reações de polimerização decorreram da seguinte maneira:

- 94°C durante 4 minutos;
- 5 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 63°C durante 2 minutos e 72°C durante 1 minuto e 20 segundos;
- 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 61°C durante 2 minutos e 72°C durante 1 minuto e 20 segundos;
- 68°C durante 60 minutos.

### 3.4. Tipagem

Os produtos de *PCR* foram separados usando o sequenciador automático *ABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*, seguindo as recomendações do fabricante relativamente às condições usadas na eletroforese.

A análise dos dados eletroforéticos realizou-se utilizando o *software GeneMapper ID-X (Applied Biosystems)*.

### 3.5. Análise estatística

O *software Arlequin v3.5* [48], foi usado para calcular as frequências alélicas e haplotípicas, a diversidade haplotípica e a distância genética  $F_{st}$  (*STRs* autossómicos e Y-*STRs*).

Usou-se o *software Structure v2.3* [49] para inferir a subestruturação populacional através dos *STRs* autossómicos.

Finalmente as nossas populações em estudo foram comparadas entre si e com uma população do Norte de Portugal, descrita anteriormente [41].

## 4. Resultados

### 4.1. Análise estatística dos dados obtidos pelos *STRs* autossómicos com recurso ao *software Arlequin*

Utilizou-se Porto, Ucrânia e Angola como diminutivos das três amostras populacionais em estudo. Angola é referente à população de Angolanos, Ucrânia é referente à população de imigrantes do leste europeu constituída por Ucrânicos a residir em Portugal e Porto à população do Norte de Portugal.

No **anexo 1.a**, **anexo 1.b** e na **tabela 3** estão representados os valores obtidos, respetivamente, para as frequências alélicas (relativas) após a análise dos *STRs* autossómicos de Angola e Ucrânia e para a heterozigosidade observada após a análise dos *STRs* autossómicos de Angola e Ucrânia, através do *software Arlequin*.

**Tabela 3** - Heterozigosidade observada após a análise dos *STR* autossómicos de Angola e Ucrânia.

<b>Locus</b>	<b>Angola</b>	<b>Ucrânia</b>	<b>Mean</b>	<b>s.d.</b>	<b>Tot. Het.</b>
<b>D8S1179</b>	0.807	0.789	0.798	0.012	0.802
<b>D21S11</b>	0.857	0.850	0.854	0.005	0.851
<b>D7S820</b>	0.791	0.828	0.810	0.026	0.812
<b>CSF1PO</b>	0.739	0.727	0.733	0.008	0.742
<b>D3S1358</b>	0.716	0.785	0.750	0.049	0.762
<b>TH01</b>	0.763	0.794	0.779	0.022	0.805
<b>D13S317</b>	0.688	0.751	0.719	0.044	0.725
<b>D16S539</b>	0.735	0.780	0.757	0.032	0.770
<b>D2S1338</b>	0.901	0.860	0.880	0.029	0.894
<b>D19S433</b>	0.793	0.834	0.813	0.029	0.818
<b>vWA</b>	0.803	0.783	0.793	0.015	0.815
<b>TPOX</b>	0.756	0.565	0.66	0.135	0.664
<b>D18S51</b>	0.873	0.874	0.874	0.001	0.877
<b>D5S818</b>	0.762	0.734	0.748	0.020	0.746
<b>FGA</b>	0.909	0.874	0.891	0.025	0.892
<b>Mean</b>	0.793	0.788	0.791	0.003	0.798
<b>s.d.</b>	0.067	0.078	0.072	0.008	0.065

Após comparação das duas populações estudadas, nas **tabelas 4 e 5** estão representados os valores obtidos respetivamente para distância genética  $F_{st}$  após a análise dos *STRs* autossómicos de Angola e Ucrânia (utilizando o método de distância: *pairwise differences*) e para a matriz de valores significativos  $F_{st}$  após a análise dos *STRs* autossómicos de Angola e Ucrânia, através do *software Arlequin*.

**Tabela 4** - Distância genética  $F_{st}$  após a análise dos *STRs* autossómicos de Angola e Ucrânia, utilizando o método de distância: *pairwise differences*.

	Angola	Ucrânia
Angola	0.000	
Ucrânia	0.019	0.000

**Tabela 5** - Matriz de valores significativos  $F_{st}$  após a análise dos *STRs* autossómicos de Angola e Ucrânia.

	Angola	Ucrânia
Angola		+
Ucrânia	+	

As duas populações comparadas apresentam distâncias genéticas significativas ( $p < 0.05$ ).

## 4.2. Análise estatística dos dados obtidos pelos Y-STRs com recurso ao software *Arlequin*

Relativamente à análise dos Y-STRs das amostras populacionais Porto, Ucrânia e Angola, os valores das frequências (relativas) haplotípicas estão apresentados no **anexo 2** e na **tabela 6** apresenta-se os valores obtidos da heterozigosidade observada após a análise dos Y-STRs das três populações em estudo, através do *software Arlequin*. No **anexo 1.c** e **anexo 1.d** estão representados os valores das frequências alélicas (relativas).

**Tabela 6** - Heterozigosidade observada após a análise dos Y-STRs das três populações em estudo.

<b>Locus</b>	<b>Porto</b>	<b>Ucrânia</b>	<b>Angola</b>	<b>Mean</b>	<b>s.d.</b>	<b>Tot. Het.</b>
<b>DYS439</b>	0.648	0.783	0.617	0.683	0.089	0.664
<b>DYS437</b>	0.592	0.647	0.000	0.413	0.359	0.596
<b>DYS390</b>	0.638	0.724	0.497	0.620	0.115	0.692
<b>DYS385</b>	0.884	0.932	0.937	0.918	0.03	0.914
<b>DYS391</b>	0.568	0.544	0.557	0.556	0.012	0.562
<b>DYS389I</b>	0.516	0.373	0.547	0.479	0.093	0.502
<b>DYS19</b>	0.613	0.803	0.563	0.660	0.127	0.678
<b>DYS389II</b>	0.688	0.798	0.797	0.761	0.063	0.723
<b>DYS393</b>	0.521	0.325	0.467	0.438	0.101	0.494
<b>DYS438</b>	0.644	0.544	0.353	0.514	0.147	0.709
<b>DYS392</b>	0.580	0.074	0.227	0.294	0.260	0.581
<b>Mean</b>	0.627	0.595	0.505	0.576	0.063	0.647
<b>s.d.</b>	0.100	0.255	0.255	0.203	0.089	0.120

Os resultados da comparação efetuada através do *software Arlequin* entre os dados haplotípicos (relativos) obtidos para as três populações estão representados nas **tabelas 7, 8 e 9**, respetivamente.

**Tabela 7** - Distância genética *Fst* após a análise dos Y-STRs das três populações em estudo, utilizando o método de distância: *pairwise differences*.

	Porto	Ucrânia	Angola
Porto	0.000		
Ucrânia	0.093	0.000	
Angola	0.180	0.139	0.000

**Tabela 8** - Média das diferenças entre as três populações em estudo após a análise dos Y-STRs, utilizando o método de distância: *pairwise differences*.

	Porto	Ucrânia	Angola
Porto	6.892		
Ucrânia	0.707	6.479	
Angola	1.497	0.976	5.560

**Tabela 9** - Matriz de valores significativos *Fst* após a análise dos Y-STRs das três populações em estudo.

	Porto	Ucrânia	Angola
Porto		+	+
Ucrânia	+		+
Angola	+	+	

As três populações comparadas apresentam distâncias genéticas significativas ( $p < 0.05$ ).

### 4.3. Análise estatística dos dados obtidos pelos *STRs* autossómicos com recurso ao *software Structure*

Ucrânia e Angola são diminutivos das duas amostras populacionais em estudo. Angola é referente à população de Angolanos, Ucrânia é referente à população de imigrantes do leste europeu constituída por Ucrânicos a residir em Portugal.

Através deste *software* investigamos a estrutura das populações anteriormente referidas. Procedemos à análise dos *STRs* autossómicos da amostra populacional Angola e a amostra populacional Ucrânia.

Este programa é um tipo de ferramenta que permite inferir a estrutura populacional com base na verificação das diferenças e/ou semelhanças entre a ancestralidade das populações, permitindo utilizar diferentes modelos de ancestralidade (Q):

- Modelo sem mistura: cada indivíduo vem exclusivamente a partir de uma das populações;
- Modelo de mistura: para cada indivíduo existe uma fração do seu genoma com origem em cada uma das populações;
- Modelo de ligação: generalização do modelo de mistura, mais adaptado aos *loci* ligados, uma vez que são mais suscetíveis de provir da mesma população;
- Modelos com antecedentes informativos: modelo padrão de mistura (*admixture model*).

As estimativas de ancestralidade individual obtidas através da análise dos *STRs* autossómicos da amostra populacional Angola e da amostra populacional Ucrânia encontram-se representadas no gráfico de barras incluído na **figura 6**. Este gráfico mostra cada indivíduo no conjunto de dados representado por uma única linha vertical dividida em K segmentos coloridos, que representam a fração estimada de pertença do indivíduo a cada uma das componentes ancestrais em estudo.





**Fig. 6** - Gráfico "*Barplot of estimates of Q*" dos STRs autossômicos, através do *software Structure*. Os números 1 e 2 correspondem à amostra populacional Angola à amostra populacional Ucrânia, respetivamente.

## 5. Discussão

No estudo dos Y-STRs utilizaram-se dois kits, *AmpFISTR™ Identifier™ Plus* (Applied Biosystems) e o *Investigator™ Argus Y-12 QS Kit* (Qiagen).

A análise do estudo das amostras populacionais Ucrânia e Angola e a sua comparação com Porto constitui num total de 223 amostras. Os dados obtidos a partir do estudo de 11 Y-STRs, permitiu identificar um total de 211 haplótipos diferentes, como já tinha sido descrito anteriormente. Existem nove haplótipos partilhados por indivíduos incluídos na amostra populacional Porto. Existe ainda a partilha de um haplótipo da amostra populacional Porto e a amostra populacional Angola. Por outro lado, não há haplótipos partilhados entre a amostra populacional Porto e a amostra populacional Ucrânia, nem entre a amostra populacional Angola e a amostra populacional Ucrânia (ver dados assinalados no **anexo 2**).

Para o estudo dos STRs autossómicos das amostras populacionais Angola e Ucrânia (ver tabelas nos **anexos 5 e 6**, respetivamente) utilizou-se o kit *AmpFISTR™ Identifier™ Plus*, possibilitando a análise de todos os loci presentes neste kit, ou seja, os loci D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, AMEL, D5S818 e FGA.

Após a análise dos dados obtidos usando o software *Arlequin*, a partir do estudo dos STRs autossómicos para a amostra populacional aqui denominada por Angola obteve-se um valor médio de diversidade genética de  $0.793 \pm 0.405$ . Verificou-se que a maior diversidade genética foi observada para o locus FGA ( $H = 0.909$ ).

Em relação à amostra populacional Ucrânia, para a mesma análise, verificou-se que o valor médio obtido para a diversidade genética é de  $0.788 \pm 0.402$ , ou seja, muito semelhante ao da população anterior. Em relação ao locus em que se obteve maior diversidade genética foi o locus D18S51 e locus FGA ( $H = 0.874$ ).

Após comparação dos dados populacionais obtidos pela análise estatística utilizando o software *Arlequin*, existem diferenças significativas da distância genética entre população angolana e a população ucraniana que reside em Portugal ( $F_{ST}$  é de aproximadamente 0.019).

Em resumo, após a análise estatística dos dados obtidos a partir dos *STRs* autossómicos de ambas as amostras populacionais Angola e Ucrânia, verificámos que, como seria de esperar, são distintas. Será importante salientar que, seria relevante aumentar a amostra populacional em ambas as populações para conseguir chegar a resultados mais concludentes. Outro facto importante a ter em conta, poderá ser a utilização exclusiva de indivíduos masculinos na análise estatística dos *STRs* autossómicos, provocando um erro sistemático.

Relativamente à análise dos Y-*STRs* das amostras populacionais Angola e Ucrânia foi necessário a utilização de *kits* diferentes, como já foi referido anteriormente. Devido à necessidade dessa utilização, a comparação entre as três populações só foi possível para 11 do total de *loci* disponíveis, usando os dados relatados por Pontes *et al.* [10] que estudou uma amostra populacional do Norte de Portugal (DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS19, DYS385, DYS393, DYS391, DYS439, DYS392, DYS437 e DYS438).

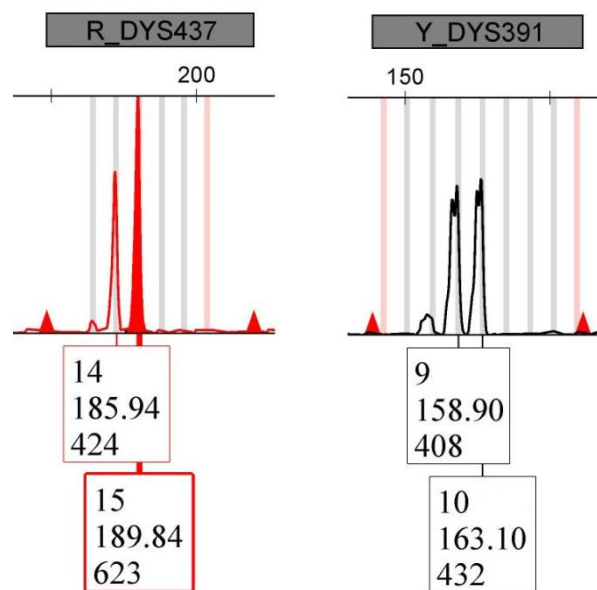
Após a análise dos Y-*STRs* da amostra populacional Porto, da amostra populacional Angola e amostra populacional Ucrânia (ver tabelas nos **anexos 7, 8 e 9**, respetivamente), com recurso ao *software Arlequin*, a média da diversidade genética é de  $0.589 \pm 0.319$  para a amostra de população de imigrantes ucranianos que vivem em Portugal e de  $0.505 \pm 0.279$  para a amostra populacional de indivíduos de Angola.

A comparação dos dados populacionais obtidos após análise com o *software Arlequin*, permitiu apurar que as distâncias genéticas entre população do Norte de Portugal e da população ucraniana que reside em Portugal ( $F_{ST}$  é de aproximadamente 0.093) e entre a população do Norte de Portugal e da amostra estudada da população de Angola ( $F_{ST}$  é de aproximadamente 0.180), são significativas. Também foi observada uma distância genética significativa entre a amostra da população de imigrantes ucranianos que vivem em Portugal e da amostra da população de indivíduos Angolanos ( $F_{ST}$  é de aproximadamente 0.139).

A maior diversidade genética foi observou-se relativamente ao *locus* DYS389II ( $H=0,723$ ) e para o sistema de *locus* duplo DYS385 ( $H=0,914$ ), como seria de prever [10, 45, 46]. Lopes *et al.* [10] analisou cinco populações distintas, todas de origem africana e chegou à conclusão que o *locus* DYS385 é bastante polimórfico e confere uma variabilidade considerável aos haplótipos obtidos para o cromossoma Y. Melo *et al.* [45] analisou uma população angolana e obteve a mesma diversidade genética para o *locus* DYS389II e para o sistema de *locus* duplo DYS385 que foi observado na nossa amostra populacional Angola. Já Mielnik-Sikorska *et al.* [46] analisou amostras provenientes da parte ocidental da Ucrânia e verificou que a maior diversidade genética

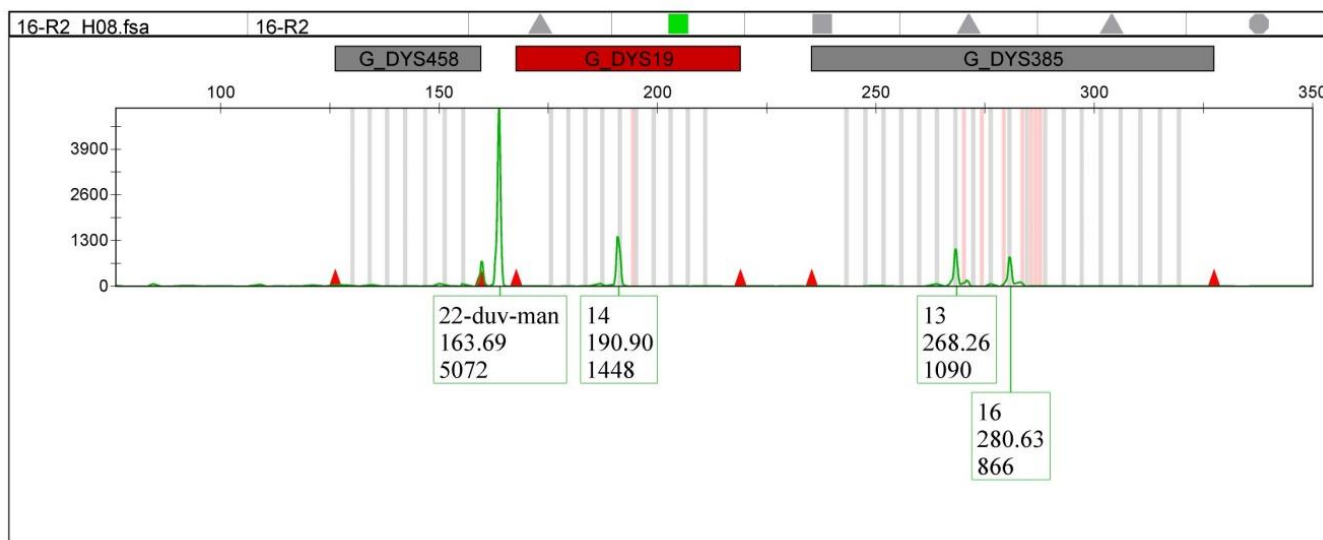
foi observada para o *locus* DYS389II e para o sistema de *locus* duplo DYS385, tal como foi observado na nossa amostra populacional Ucrânia.

Num dos 27 indivíduos analisados da amostra populacional Ucrânia (tabela disponível no **anexo 8**), foi observado um alelo duplicado no *locus* DYS437 e no DYS391. De acordo com Diederiche *et al.* [14] estes alelos duplicados no *loci* DYS437 já foram observadas em diferentes populações. Já Zastera *et al.* [50] após a análise de amostra populacional da República Checa descobriu alelos duplicados no *locus* DYS391 e no DYS437 e foi possível observar três alelos no *locus* DYS385. Também foram identificados alelos nulos no *locus* DYS437.

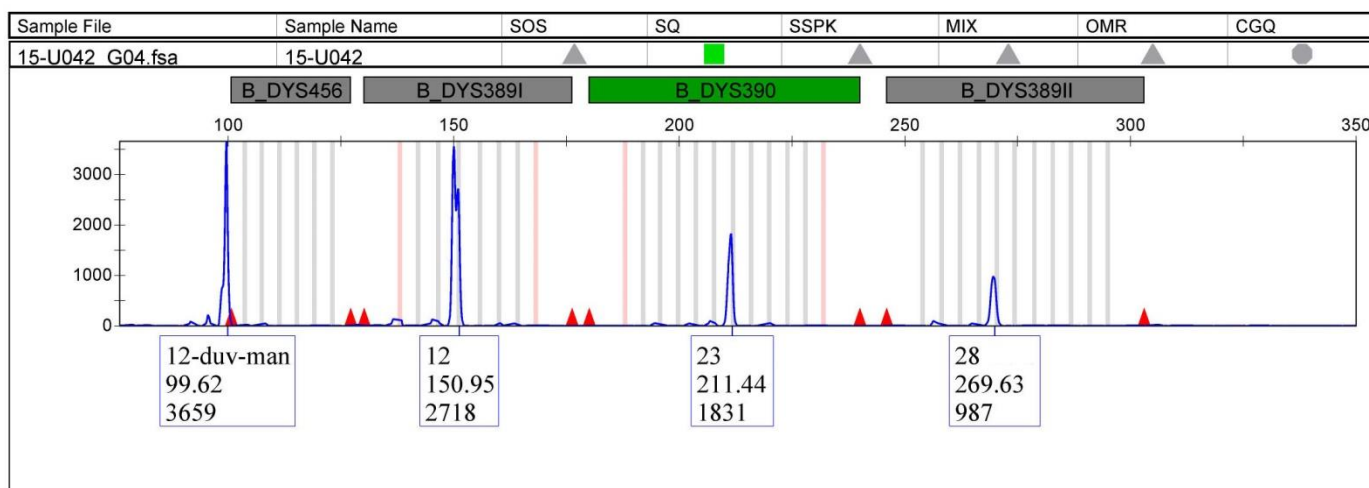


**Fig. 7** - Alelo duplicado no *locus* DYS437 e no DYS391 numa amostra que provém da amostra populacional Ucrânia, após análise dos Y-STRs.

Em duas amostras distintas foram ainda observados, no *locus* DYS456 e no DYS458, alelos que não estão incluídos no *ladder* do *kit*, mas já haviam sido descritos e reportados em bases de dados, como a YHRD, apresentados na **figura 8 e 9**.

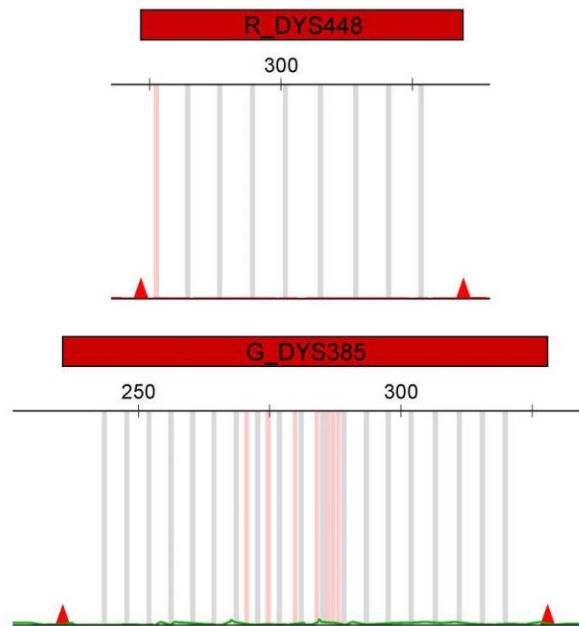


**Fig. 8** - Alelo que não está incluído no *ladder* do *kit*, presente no *locus* DYS458, observados numa das amostras da população Ucraniana, após análise dos Y-STRs, possivelmente corresponde ao alelo 22 (cálculo manual).



**Fig. 9** - Alelo que não está incluído no *ladder* do *kit*, presente no *locus* DYS456, observados numa das amostras da população Ucraniana, após análise dos Y-STRs, possivelmente corresponde ao alelo 12 (cálculo manual).

Na **figura 10** apresentam-se eletroforetogramas (*ECG*) que correspondem os *loci* DYS448 e DYS385 onde não foram detetados picos, correspondendo possivelmente a alelos nulos, após a análise Y-STRs da amostra populacional Ucrânia, mesmo após repetição da amplificação.



**Fig. 10** – Eletroforetogramas referentes aos *loci* DYS448 e DYS385, após a análise Y-STRs da amostra populacional Ucrânia, onde não se detetam fragmentos, correspondendo a possíveis alelos nulos.

Em relação à amostra populacional Angola, após a sua análise, não há nada de relevante a referir, tirando o facto da colheita e/ou acondicionamento das amostras de sangue ter sido feita com utilização de anticoagulantes (supõe-se que heparina), dificultando a análise dos Y-STRs pelo *kit AmpFISTR™ Yfiler™*. Devido a esse fato foi utilizado o *kit Investigator™ Argus Y-12 QS*. Esse *kit*, como já foi referido anteriormente, é constituído por apenas 12 marcadores (DYS19, DYS385, DYS389-I, DYS389-II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438, DYS439), ou seja, contém menos 4 marcadores que o *kit AmpFISTR™ Yfiler™*, havendo assim uma diminuição do poder de discriminação em relação às restantes amostras populacionais

Em resumo, após a análise dos Y-STRs através do *software Arlequin* das amostras populacionais Porto, Angola e Ucrânia, demonstram que estas populações embora apresentem distâncias genéticas significativas, partilham haplótipos entre elas. É importante frisar que, seria relevante aumentar a amostra populacional em ambas as populações para conseguir chegar a resultados mais concludentes.

De acordo com Aboukhalid *et al.* [51], em dois indivíduos distintos das amostras populacionais descritas não foram detetados alelos para o *loci* DYS456 e DYS458, correspondendo possivelmente a alelos nulos, e detetaram-se alelos duplicados nos *loci*

DYS448 e DYS456. A maior diversidade genética foi registada para o sistema duplicado DYS385 e para o sistema de *locus* único DYS458.

Após a análise de vários estudos, a outras amostras populacionais foram observados alguns alelos pouco habituais referentes a determinados sistemas comuns aos *loci* aqui descritos.

Outros autores descreveram a existência de um indivíduo que apresentava dois alelos no *locus* DYS389II, no DYS437 e no DYS439 [18], quando na realidade estamos apenas perante uma amostra com três mutações. Esta situação poderia ser confundida com uma mistura de amostras provenientes de dois dadores masculinos diferentes. Para a criminalística esta possibilidade de encontrar alelos múltiplos constitui um grande entrave. Teria de se proceder à repetição das análises para tentar perceber se na realidade estaríamos ou não perante uma mistura, o que além de tornar, o processo mais dispendioso também iria aumentar o tempo total da investigação para uma melhor análise deste caso. Neste caso específico, o uso de outros *kits* com um maior poder de discriminação, é certamente a melhor solução.

Ballard et al. [37] num caso semelhante tentou demonstrar que com treze Y-STRs seria possível chegar a um resultado bastante mais informativo. Neste estudo, a análise do *locus* DYS385 revelou um elevado número de alelos intermédios, duplicados e/ou resultantes de mutações. O mesmo aconteceu relativamente ao *locus* DYS391. Ou seja, após este estudo chegou à conclusão que com treze Y-STRs obteve um resultado menos informativo devido à redução de marcadores efetivos presentes.

Para as análises de evidências forenses que envolvem misturas de células femininas e masculinas, testes de paternidade, e outro tipo de estudos como investigações históricas, estudos de padrões de migração humana e estudo de genealogias, os *kits* comerciais atualmente disponíveis possibilitam um poder de discriminação suficiente para resolver de forma satisfatória qualquer tipo de caso. Quando nos deparamos com casos mais complexos, quer na criminalística, em que os supostos autores de determinado crime são relacionados por via paterna, quer em testes de paternidade, em que os dois supostos pais são aparentados por via paterna, novos *kits* com elevado poder de discriminação devem ser introduzidos.

Novos *kits* incluem os *rapidly mutating Y-STR*. Além do seu poder de discriminação ser elevado e dos poucos marcadores que compõem o *kit*, estes permitem distinguir entre parentes masculinos e até a distinção entre pares pai-filho [21, 40]. Estes novos *kits* são a chave na resolução de casos mais complexos com que diariamente se deparam os peritos forenses.



## 6. Conclusões

Apesar dos Y-STRs serem já muito estudados e conhecidos, continuam a ser marcadores muito úteis em genética forense para a distinção entre indivíduos de diferentes origens populacionais como ficou demonstrado neste trabalho. O facto da colheita e/ou acondicionamento das amostras de sangue dos indivíduos de Angola ter sido feita com utilização de anticoagulantes (supõe-se que heparina), não permitiu a utilização do *kit AmpFISTR™ Yfiler™*, dificultando a análise dos Y-STRs.



Após a análise dos Y-STRs, o objetivo principal deste estudo, das amostras populacionais Porto, Angola e Ucrânia, ficou demonstrado que estas populações apresentam distâncias genéticas significativas, embora haja partilha de haplótipos entre estas três populações. É importante de salientar a utilidade dos dados obtidos a partir da caracterização destas duas últimas populações, Angola e Ucrânia, na constituição de bases de dados com utilidade forense.



O estudo dos STRs autossómicos, nas populações Angolana e Ucrâniana, através do *software Structure*, revelou ausência de subestruturação populacional apreciável entre estas populações para este conjunto de marcadores.



Hoje em dia, a necessidade de resolver crimes de agressão sexual e analisar cenários de parentesco em áreas como a imigração, a paternidade, pessoas desaparecidas, e desastres de massa continuará a constituir um papel importante no futuro a desenvolver pela ciência forense na sociedade. Os novos *kits* comerciais que incluem Y-STRs têm incluindo soluções novas, tais como o uso *RM Y-STRs* que já permitem distinguir indivíduos aparentados por via paterna, incluindo distinções entre pares pai-filho, o que ainda não era possível com os *kits* anteriores. Tanto os STRs autossómicos como os Y-STRs, continuam a constituir um terreno fértil para o futuro da investigação forense, permitindo análises de baixo custo e sem necessidade de elevados tempos de investigação.

Finalmente, é importante salientar que, seria de todo o interesse aumentar a amostra populacional, inserir novas amostras populacionais de estudos posteriores com Y-STRs e incluir os RM Y-STR nesses estudos e comparar os dados obtidos com os dados existentes em bases de dados, como por exemplo YHRD (*colocar nas abreviaturas*).

## 7. Referências Bibliográficas

1. Skaletsky, H., et al., *The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes*. Nature, 2003. **423**(6942): p. 825-37.
2. Rosser, Z.H., P. Balaresque, and M.A. Jobling, *Gene conversion between the X chromosome and the male-specific region of the Y chromosome at a translocation hotspot*. Am J Hum Genet, 2009. **85**(1): p. 130-4.
3. Cortez, D., et al., *Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals*. Nature, 2014. **508**(7497): p. 488-93.
4. Trombetta, B., et al., *Inter- and intraspecies phylogenetic analyses reveal extensive X-Y gene conversion in the evolution of gametologous sequences of human sex chromosomes*. Mol Biol Evol, 2014. **31**(8): p. 2108-23.
5. Clark, A.G., *Genetics: The vital Y chromosome*. Nature, 2014. **508**(7497): p. 463-5.
6. Jobling, M.A. and C. Tyler-Smith, *The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age*. Nat Rev Genet, 2003. **4**(8): p. 598-612.
7. Iida, R. and K. Kishi, *Identification, characterization and forensic application of novel Y-STRs*. Leg Med (Tokyo), 2005. **7**(4): p. 255-8.
8. Cruciani, F., et al., *About the X-to-Y gene conversion rate*. Am J Hum Genet, 2010. **86**(3): p. 495-7; author reply 497-8.
9. Trombetta, B., et al., *Footprints of X-to-Y gene conversion in recent human evolution*. Mol Biol Evol, 2010. **27**(3): p. 714-25.
10. Lopes, V., et al., *Y-chromosome STRs DYS385, DYS19, DYS389-I and II, DYS390, DYS391, DYS392 and DYS393 in five African populations*. International Congress Series, 2003. **1239**: p. 439–442.
11. Cruciani, F., et al., *A revised root for the human Y chromosomal phylogenetic tree: the origin of patrilineal diversity in Africa*. Am J Hum Genet, 2011. **88**(6): p. 814-8.

12. Underhill, P.A. and T. Kivisild, *Use of y chromosome and mitochondrial DNA population structure in tracing human migrations*. Annu Rev Genet, 2007. **41**: p. 539-64.
13. Ballantyne, K.N., et al., *Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications*. Am J Hum Genet, 2010. **87**(3): p. 341-53.
14. Helgason, A., et al., *The Y-chromosome point mutation rate in humans*. Nat Genet, 2015. **47**(5): p. 453-7.
15. Rozen, S., et al., *Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes*. Nature, 2003. **423**(6942): p. 873-6.
16. Hallast, P., et al., *Recombination dynamics of a human Y-chromosomal palindrome: rapid GC-biased gene conversion, multi-kilobase conversion tracts, and rare inversions*. PLoS Genet, 2013. **9**(7): p. e1003666.
17. Rebala, K., et al., *Y-STR variation among Slavs: evidence for the Slavic homeland in the middle Dnieper basin*. J Hum Genet, 2007. **52**(5): p. 406-14.
18. Diederiche, M., et al., *A case of double alleles at three Y-STR loci: forensic implications*. Int J Legal Med, 2005. **119**(4): p. 223-5.
19. Roewer, L., *Y chromosome STR typing in crime casework*. Forensic Sci Med Pathol, 2009. **5**(2): p. 77-84.
20. Diegoli, T.M., *Forensic typing of short tandem repeat markers on the X and Y chromosomes*. Forensic Sci Int Genet, 2015. **18**: p. 140-51.
21. Ballantyne, K.N., et al., *A new future of forensic Y-chromosome analysis: rapidly mutating Y-STRs for differentiating male relatives and paternal lineages*. Forensic Sci Int Genet, 2012. **6**(2): p. 208-18.
22. Hanson, E.K. and J. Ballantyne, *Comprehensive annotated STR physical map of the human Y chromosome: Forensic implications*. Leg Med (Tokyo), 2006. **8**(2): p. 110-20.
23. Pinheiro, M.d.F., *Genética Forense: Perspectivas da Identificação Genética*. 2010, Porto: Edições Universidades Fernando Pessoa. 412.

24. Kayser, M., et al., *Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study*. Int J Legal Med, 1997. **110**(3): p. 125-33, 141-9.
25. Buckleton, J.S., M. Krawczak, and B.S. Weir, *The interpretation of lineage markers in forensic DNA testing*. Forensic Sci Int Genet, 2011. **5**(2): p. 78-83.
26. Sanchez, J.J., et al., *Duplications of the Y-chromosome specific loci P25 and 92R7 and forensic implications*. Forensic Sci Int, 2004. **140**(2-3): p. 241-50.
27. Wei, W., et al., *A comparison of Y-chromosomal lineage dating using either resequencing or Y-SNP plus Y-STR genotyping*. Forensic Sci Int Genet, 2013. **7**(6): p. 568-72.
28. Pemberton, T.J., et al., *Sequence determinants of human microsatellite variability*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 612.
29. Goodwin, W., A. Linacre, and S. Hadi, *An introduction to Forensic Genetics*. 2010, England: Wiley. 214.
30. Kayser, M., et al., *A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(6): p. 1183-97.
31. Zhivotovsky, L.A., et al., *The effective mutation rate at Y chromosome short tandem repeats, with application to human population-divergence time*. Am J Hum Genet, 2004. **74**(1): p. 50-61.
32. Amorim, A., *A cautionary note on the evaluation of genetic evidence from uniparentally transmitted markers*. Forensic Sci Int Genet, 2008. **2**(4): p. 376-8.
33. Hanson, E.K., P.N. Berdos, and J. Ballantyne, *Testing and evaluation of 43 "noncore" Y chromosome markers for forensic casework applications*. J Forensic Sci, 2006. **51**(6): p. 1298-314.
34. Goedbloed, M., et al., *Comprehensive mutation analysis of 17 Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms included in the AmpFISTR Yfiler PCR amplification kit*. Int J Legal Med, 2009. **123**(6): p. 471-82.
35. Vermeulen, M., et al., *Improving global and regional resolution of male lineage differentiation by simple single-copy Y-chromosomal short tandem repeat polymorphisms*. Forensic Sci Int Genet, 2009. **3**(4): p. 205-13.

36. Gao, T., et al., *Phylogenetic analysis and forensic characteristics of 12 populations using 23 Y-STR loci*. Forensic Sci Int Genet, 2015. **19**: p. 130-3.
37. Ballard, D.J., et al., *A study of mutation rates and the characterisation of intermediate, null and duplicated alleles for 13 Y chromosome STRs*. Forensic Sci Int, 2005. **155**(1): p. 65-70.
38. Turrina, S., et al., *Are rapidly mutating Y-short tandem repeats useful to resolve a lineage? Expanding mutability data on distant male relationships*. Transfusion, 2016. **56**(2): p. 533-8.
39. Brito, P., et al., *Study of rapidly mutating Y-STRs in a Portuguese population*. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2013. **4**(1): p. e83-e84.
40. Ballantyne, K.N., et al., *Toward male individualization with rapidly mutating y-chromosomal short tandem repeats*. Hum Mutat, 2014. **35**(8): p. 1021-32.
41. Pontes, M.L., et al., *Allele frequencies and population data for 17 Y-STR loci (AmpFISTR Y-filer) in a Northern Portuguese population sample*. Forensic Sci Int, 2007. **170**(1): p. 62-7.
42. *Novo Atlas Mundial*, in *Nova Enciclopédia Portuguesa* 1996, Clube Internacional do Livro: Alfragide.
43. Kitoko, D.Z., *A Informação Geográfica em Angola: Subsídios para Elaboração de uma Estratégia e Plano de Ação de apoio à implementação do Plano Nacional de Informação Geográfica*. 2014. p. 107.
44. Melo, M.M., et al., *Genetic study of 15 STRs loci of Identifiler system in Angola population*. Forensic Sci Int Genet, 2010. **4**(5): p. e153-7.
45. Melo, M.M., et al., *Y-STR haplotypes in three ethnic linguistic groups of Angola population*. Forensic Sci Int Genet, 2011. **5**(3): p. e83-8.
46. Mielnik-Sikorska, M., et al., *Genetic data from Y chromosome STR and SNP loci in Ukrainian population*. Forensic Sci Int Genet, 2013. **7**(1): p. 200-3.
47. Walsh, P.S., D.A. Metzger, and R. Higuchi, *Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material*. Biotechniques, 1991. **10**(4): p. 506-13.

48. Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider, *Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis*. Evol Bioinform Online, 2005. 1: p. 47-50.
49. Hubisz, M.J., et al., *Inferring weak population structure with the assistance of sample group information*. Mol Ecol Resour, 2009. 9(5): p. 1322-32.
50. Zastera, J., et al., *Assembly of a large Y-STR haplotype database for the Czech population and investigation of its substructure*. Forensic Sci Int Genet, 2010. 4(3): p. e75-8.
51. Aboukhalid, R., et al., *Haplotype frequencies for 17 Y-STR loci (AmpFISTR-Y-filer) in a Moroccan population sample*. Forensic Sci Int Genet, 2010. 4(3): p. e73-4.

## 8. Anexos

**Anexo 1.a** - Valores das frequências (relativas) alélicas dos *STRs* autossómicos da amostra populacional Angola (n=25), pela análise do *software Arlequin*.

Alelos	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
5								0.020							
6						0.140						0.080			
7			0.060	0.060		0.380						0.020			
8			0.200	0.040		0.260		0.040				0.420		0.080	
9			0.080	0.060		0.100	0.020	0.100				0.140			
9.3						0.100									
10	0.020		0.300	0.440		0.020	0.080	0.040				0.074	0.020	0.020	
11	0.040		0.280	0.120			0.400	0.460		0.080		0.296		0.340	
12	0.120		0.080	0.240			0.380	0.200		0.040			0.060	0.280	
12.2										0.060					
13	0.220			0.040			0.120	0.120		0.360			0.040	0.220	
13.2										0.020			0.020		
14	0.300				0.080			0.020		0.260	0.040		0.020	0.060	
14.2										0.060					
15	0.220				0.300					0.100	0.220		0.240		
15.2										0.020					



16	0.080	0.380	0.080	0.320	0.200	
17		0.240	0.100	0.200	0.140	
18			0.020	0.100	0.120	0.020
18.2						0.040
19			0.100	0.100	0.020	0.100
19.2						0.020
20			0.100		0.060	0.080
20.2					0.040	
21			0.180	0.020	0.020	0.060
22			0.120			0.180
23			0.100			0.160
24			0.140			0.140
25			0.060			0.080
26						0.020
27	0.040					0.020
28	0.280					0.040
29	0.160					
30	0.160					0.020
31	0.100					
31.2	0.120					0.020
32	0.020					
32.2	0.040					

33.2	0.020
34	0.020
35	0.040

---

**Anexo 1.b** - Valores das frequências (relativas) alélicas dos *STRs* autossômicos da amostra populacional Ucrânia (n=27), pela análise do software *Arlequin*.

Alelos	D8S1179	D21S11	D7S820	CSF1PO	D3S1358	TH01	D13S317	D16S539	D2S1338	D19S433	vWA	TPOX	D18S51	D5S818	FGA
6						0.204									
7			0.019			0.148									
8			0.185			0.130	0.130					0.593			
9			0.167	0.074		0.204	0.037	0.190				0.037		0.019	
9.3						0.315									
10	0.093		0.296	0.333			0.074	0.056				0.074		0.111	
11	0.037		0.130	0.333			0.426	0.241				0.296		0.389	
12	0.093		0.130	0.241			0.222	0.333		0.037			0.037	0.296	
12.2										0.019					
13	0.370		0.056	0.019			0.093	0.167		0.222			0.111	0.167	
13.2										0.019					
14	0.241		0.019		0.074		0.019	0.019		0.278	0.056		0.167	0.019	
14.2										0.037					
15	0.093				0.315				0.019	0.204	0.093		0.185		0.019
15.2										0.074					
16	0.056				0.222				0.074	0.037	0.130		0.204		
16.2										0.056					
17	0.019				0.186				0.296	0.019	0.259		0.111		

18		0.204		0.056	0.352	0.056	0.019
19				0.093	0.111	0.093	0.056
20				0.167		0.019	0.185
21						0.019	0.185
22				0.019			0.185
23				0.093			0.074
24				0.093			0.130
25				0.074			0.111
26				0.019			0.037
27	0.019						
28	0.278						
29	0.167						
30	0.185						
30.2	0.074						
31	0.056						
31.2	0.056						
32.2	0.074						
33.2	0.093						

**Anexo 1.c** - Valores das frequências (relativas) alélicas dos Y-STRs das amostras populacionais Ucrânia (n=27), pela análise do *software* Arlequin.

Alelos	DYS439	DYS437	DYS390	DYS391	DYS389I	DYS19	DYS389II	DYS393	DYS438	DYS392	Genótipos	DYS385
9									0.111		11-12	0.038
10	0.148			0.556					0.630		11-13	0.077
11	0.296			0.407					0.259	0.963	11-14	0.077
12	0.333				0.185			0.148			11-15	0.077
13	0.148				0.778	0.148		0.815			12-13	0.077
14		0.444			0.037	0.185		0.037		0.037	12-14	0.038
14.3						0.074					12-15	0.038
15	0.037	0.407				0.148					13-15	0.038
16		0.111				0.370					13-16	0.038
17	0.037					0.074					13-17	0.038
22			0.111								14.3	0.231
23			0.111								14-15	0.038
24			0.407								14-16.3	0.038
25			0.333								16-16.3	0.038
26			0.037								16-17	0.115
28							0.111					
29							0.333					
30							0.259					

31			0.185
32			0.074
33			0.037
R	0.037		
R <sub>1</sub>		0.037	

---

R - corresponde a um alelo duplicado 14-15

R<sub>1</sub> - corresponde a um alelo duplicado 9-10

**Anexo 1.d** - Valores das frequências (relativas) alélicas dos Y-STRs das amostras populacionais Angola (n=25) pela análise do *software Arlequin*.

Alelos	DYS439	DYS437	DYS390	DYS391	DYS389I	DYS19	DYS389II	DYS393	DYS438	DYS392	Genótipos	DYS385
9				0.040							11-14	0.040
10				0.440					0.120	0.040	11-15	0.040
11	0.520			0.520					0.800	0.880	13-19	0.040
12	0.360				0.160			0.080	0.080		14-15	0.040
13	0.080				0.640	0.040		0.720		0.080	14-16	0.040
14	0.040	1.000			0.200	0.200		0.160			14-18	0.040
15						0.640		0.040			14-19	0.040
16						0.080					14-20	0.040
17						0.040					15-17	0.040
21			0.680								15-17.3	0.040
22			0.040								15-18	0.040
24			0.240								16-16	0.160
25			0.040								16-16.3	0.200
28							0.120				16-20	0.120
29							0.160				17-17	0.040
30							0.320				17-18	0.040
31							0.280					
32							0.120					

**Anexo 2** - Valores das frequências (relativas) haplotípicas dos Y-STRs das amostras populacionais Porto (P), Ucrânia (U) e Angola (A), pela análise do *software* Arlequin.

Identificação do haplótipo	Definição do haplótipo (DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS19, DYS385, DYS393, DYS391, DYS439, DYS392, DYS437 e DYS438)	Porto (n=175)	Ucrânia (n=27)	Angola (n=25)
P001	11 15 24 11-14 11 13 15 30 14 12 13	0.006	0	0
P002 P101	12 15 24 11-14 11 13 15 29 13 12 13	0.011	0	0
P003	11 15 25 11-14 10 13 14 29 12 13 13	0.006	0	0
P004	12 16 23 14-14 11 12 14 28 13 10 12	0.006	0	0
P005	13 15 24 11-15 11 13 14 30 12 12 13	0.006	0	0
P006	10 15 24 12-14 11 12 15 26 13 12 14	0.006	0	0
P007	11 16 22 12-15 10 12 14 27 13 10 11	0.006	0	0
P008	11 16 23 14-15 10 12 14 28 13 10 11	0.006	0	0
P009	12 15 24 11-14 11 13 14 29 13 11 13	0.011	0	0
P010	11 15 24 11-15 10 13 16 29 13 12 13	0.006	0	0
P011	12 15 25 11-11 11 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0



P012	13 14 26 16-17 10 13 13 32 13 10 11	0.006	0	0
P013	11 15 23 13-17 10 13 14 30 12 9 11	0.006	0	0
P014	11 16 22 13-16 11 12 15 29 12 9 11	0.006	0	0
P015	11 14 23 11-14 10 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P016 P084	12 15 24 11-14 11 14 14 30 13 12 13	0.011	0	0
P017	11 14 22 15-16 10 14 15 32 15 10 12	0.006	0	0
P018	11 15 26 13-14 10 13 14 29 12 9 11	0.006	0	0
P019	13 16 23 11-15 11 13 14 30 13 12 13	0.006	0	0
P020	12 15 24 11-14 12 13 13 29 12 12 13	0.006	0	0
P021	12 14 24 11-15 12 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P022	13 14 25 15-18 10 12 15 28 12 9 11	0.006	0	0
P023	12 15 24 11-13 11 13 14 29 14 12 13	0.006	0	0
P024	11 14 23 13-17 10 14 15 30 12 9 11	0.006	0	0
P025	11 14 22 13-17 10 14 15 31 13 10 12	0.006	0	0

P026	11 14 21 14-17 10 15 15 32 14 11 12	0.006	0	0
P027	12 15 24 11-15 11 13 14 29 12 12 13	0.006	0	0
P028	13 15 24 11-14 11 14 15 30 13 12 13	0.006	0	0
P029	13 14 24 16-19 10 14 13 31 12 11 11	0.006	0	0
P030	11 15 24 11-14 11 14 14 30 12 12 13	0.006	0	0
P031	12 15 24 12-14 11 13 13 29 13 12 13	0.006	0	0
P032	12 15 24 11-13 11 13 14 29 14 13 13	0.006	0	0
P033	13 15 25 12-15 10 13 16 31 14 10 12	0.006	0	0
P034	11 15 25 11-14 10 13 14 30 12 13 13	0.006	0	0
P035	10 14 24 13-15 9 14 13 30 13 10 11	0.011	0	0
P047				
P036	13 16 22 13-16 10 12 15 29 12 9 10	0.006	0	0
P037	11 14 24 13-16 9 13 15 29 12 9 11	0.006	0	0
P038	11 15 23 11-15 11 13 14 27 13 12 13	0.011	0	0
P039	10 14 25 13-14 9 14 13 31 13 10 11	0.006	0	0

P040	14 14 24 15-15 11 13 14 31 13 10 11	0.006	0	0
P041	12 16 21 15-15 11 12 16 29 14 10 11	0.006	0	0
P042	13 15 24 12-15 11 13 14 29 14 12 13	0.006	0	0
P043	11 15 23 12-12 10 13 16 28 13 10 11	0.006	0	0
P044	12 16 23 14-15 10 12 15 28 14 10 11	0.006	0	0
P045	13 15 24 12-15 11 13 14 30 14 10 13	0.006	0	0
P046	11 15 24 11-15 11 14 15 29 13 12 13	0.006	0	0
P048	12 15 24 11-14 11 13 15 28 13 12 13	0.006	0	0
P049	11 15 23 12-12 10 13 17 28 14 10 11	0.006	0	0
P050	12 14 24 13-15 9 12 15 28 12 9 11	0.006	0	0
P051	12 14 25 11-12 11 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P052	13 14 23 12-13 11 12 14 29 13 10 11	0.006	0	0
P053	11 16 23 13-14 10 12 14 28 13 10 11	0.006	0	0
P054	11 14 24 11-14 11 14 14 30 13 12 13	0.006	0	0

P055 A12377	12 14 24 11-14 10 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0.04
P056 P064 P092 P159	12 15 24 11-14 11 13 14 29 13 12 13	0.029	0	0
P057	12 15 24 11-15 11 13 15 29 13 12 13	0.006	0	0
P058	12 15 24 11-14 10 13 14 29 14 12 13	0.006	0	0
P059	11 15 25 11-14 10 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P060	12 14 24 15-18 11 13 13 30 13 10 11	0.006	0	0
P061	12 14 24 11-15 11 13 14 29 13 12 12	0.006	0	0
P062	11 15 23 11-14 10 13 14 29 13 12 14	0.006	0	0
P063	11 15 23 12-12 10 13 17 27 13 10 11	0.006	0	0
P065	11 16 24 12-14 11 13 14 30 13 12 13	0.006	0	0
P066	11 15 24 11-14 11 13 15 29 13 12 13	0.006	0	0
P067	12 15 24 13-15 10 14 15 29 13 11 13	0.006	0	0

P068	22 15 24 12-12 10 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P069	12 14 24 12-15 11 14 14 30 13 12 13	0.006	0	0
P070	13 14 22 13-19 10 13 14 29 13 10 11	0.011	0	0
P072				
P071	12 15 24 11-14 10 13 14 29 13 12 13	0.011	0	0
P095				
P073	11 15 24 11-15 11 13 14 30 13 12 13	0.006	0	0
P074	11 15 22 13-14 10 12 15 28 13 10 11	0.006	0	0
P075	12 15 24 11-15 10 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P076	10 14 24 16-18 10 12 13 30 13 11 11	0.006	0	0
P077	12 14 24 11-15 10 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P078	11 14 24 11-11 11 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P079	11 14 24 13-18 10 13 15 31 12 10 11	0.006	0	0
P080	13 15 24 11-14 11 13 14 29 13 12 12	0.006	0	0
P081	11 15 22 14-15 10 12 15 30 14 10 11	0.006	0	0
P082	11 16 25 13-17 10 12 16 28 12 9 11	0.006	0	0

P083	12 15 24 12-14 11 14 14 30 13 12 13	0.006	0	0
P085	13 15 24 11-14 12 13 15 29 13 12 13	0.006	0	0
P086	11 15 22 13-15 10 13 14 31 12 9 11	0.006	0	0
P087	12 16 22 13-14 10 12 15 28 13 10 11	0.006	0	0
P088	11 14 23 13-15 10 13 14 30 12 10 11	0.006	0	0
P089	12 14 23 13-16 9 13 15 29 12 9 11	0.006	0	0
P090	13 14 24 16-18 10 14 13 31 13 10 11	0.006	0	0
P091	12 17 23 11-13 10 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P093	12 15 24 11-12 10 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P094	12 15 25 11-14 11 13 14 29 13 12 12	0.006	0	0
P096	12 15 24 11-14 10 13 14 28 13 12 13	0.006	0	0
P097	12 14 24 16-19 10 13 12 30 12 10 11	0.006	0	0
P098	10 14 25 13-14 9 14 13 30 13 10 11	0.006	0	0
P099	11 16 25 11-14 11 13 14 29 13 12 14	0.006	0	0

P100	12 15 22 14-16 11 13 16 29 12 9 11	0.006	0	0
P102	11 15 24 11-15 11 13 14 30 13 11 13	0.006	0	0
P103	12 14 23 12 10 13 16 28 13 10 11	0.006	0	0
P104	12 16 22 14-15 10 12 15 29 14 10 11	0.006	0	0
P105	11 14 24 12-17 11 13 17 30 13 10 11	0.006	0	0
P106	11 14 24 11-14 11 14 14 30 14 12 13	0.006	0	0
P107	11 16 23 13-17 10 12 15 28 13 10 11	0.006	0	0
P108	12 15 24 11-14 11 13 15 30 15 12 13	0.006	0	0
P109	12 14 24 16-18 10 14 13 31 13 10 11	0.006	0	0
P110	11 14 25 14-16 10 12 15 28 13 9 14	0.006	0	0
P111	12 14 24 11-15 11 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P112	12 15 24 11-13 11 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P113	12 15 24 11-12 11 13 15 29 13 12 13	0.006	0	0
P114	12 15 24 14-15 10 13 15 29 13 12 13	0.006	0	0

P115	11 14 23 13-15 10 14 14 31 12 10 11	0.006	0	0
P116	12 15 24 11-15 11 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P117	11 16 22 14-16 10 11 16 27 14 11 12	0.006	0	0
P118	11 14 25 14-18 10 13 14 29 12 10 11	0.006	0	0
P119	12 15 24 11-14 11 13 15 29 13 12 14	0.006	0	0
P120	12 14 23 16-20 10 13 13 30 13 10 11	0.006	0	0
P121	12 15 24 11-11 11 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P122	12 15 23 11-14 10 13 14 29 13 13 13	0.006	0	0
P123	12 15 24 10-14 10 13 15 29 13 12 13	0.006	0	0
P124	13 14 24 12-15 10 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P125	12 14 22 14-19 10 13 14 31 12 10 11	0.006	0	0
P126	12 14 24 11-14 11 13 14 29 13 9 13	0.006	0	0
P127	13 14 23 12-20 10 13 14 30 12 10 11	0.006	0	0
P128	13 15 23 12-14 10 13 15 29 13 12 13	0.006	0	0



P129	11 16 22 13-14 10 12 14 28 13 10 11	0.006	0	0
P130	11 14 23 13-15 11 13 15 30 12 9 11	0.011	0	0
P131 P168	12 15 24 11-14 10 13 14 29 12 12 13	0.011	0	0
P132	12 15 24 12-14 10 13 14 29 12 12 13	0.006	0	0
P133	10 14 25 14-14 9 14 13 30 13 10 11	0.006	0	0
P134	11 16 21 15-15 11 12 16 28 14 10 11	0.006	0	0
P135	12 14 23 14-17 10 14 14 29 13 9 13	0.006	0	0
P136	12 14 22 13-16 10 13 14 29 12 8 11	0.006	0	0
P137	11 15 23 13-17 10 13 14 29 12 9 12	0.006	0	0
P138	12 15 23 11-14 11 13 14 29 13 13 13	0.006	0	0
P139	13 14 24 11-12 12 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P140	12 14 24 11-14 11 13 13 29 13 12 14	0.006	0	0
P141	12 15 24 11-15 10 13 14 28 14 12 13	0.006	0	0
P142	13 14 24 16-18 10 13 13 30 13 10 11	0.006	0	0

P143	12 15 24 11-14 10 14 14 30 13 12 13	0.006	0	0
P144	12 15 24 11-14 11 13 14 31 14 12 13	0.006	0	0
P145	12 14 24 16-16 10 12 13 30 13 10 11	0.006	0	0
P146	12 14 24 11-14 11 12 13 28 13 12 14	0.006	0	0
P147	11 15 22 13-17 9 13 14 29 12 9 11	0.006	0	0
P148	11 15 24 11-14 11 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P149	11 15 24 11-13 10 14 14 30 14 12 13	0.006	0	0
P150	12 15 26 11-14 10 12 14 28 14 12 13	0.006	0	0
P151	13 14 24 11-15 10 12 14 28 13 12 13	0.011	0	0
P152				
P153	12 15 24 11-14 11 14 14 30 13 11 13	0.006	0	0
P154	12 14 24 11-13 11 13 15 30 13 12 13	0.006	0	0
P155	12 15 24 11-13 11 14 14 30 14 12 13	0.006	0	0
P156	12 14 23 15-17 10 13 14 30 13 10 11	0.006	0	0
P157	11 16 21 13-14 10 12 16 29 15 10 11	0.011	0	0
P158				

P160	12 14 27 16-17 10 13 13 32 13 10 11	0.006	0	0
P161	11 15 23 11-14 11 13 14 29 12 12 13	0.006	0	0
P162	11 14 24 16-18 10 13 13 30 13 10 11	0.006	0	0
P163	11 15 26 11-14 10 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P164	12 15 23 11-14 11 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P165	12 14 24 17-17 10 13 13 31 13 10 11	0.006	0	0
P166	13 15 24 11-14 10 13 14 29 13 12 13	0.006	0	0
P167	11 14 23 14-16 10 14 14 32 13 9 13	0.006	0	0
P169	12 15 24 11-15 11 13 15 30 13 12 13	0.006	0	0
P170	12 15 25 11-14 11 13 14 29 12 12 13	0.006	0	0
P171	13 15 24 11-14 10 14 15 31 13 12 13	0.006	0	0
U001	12 15 25 14-17 11 12 16 29 13 10 11	0	0.037	0
U002	11 16 22 12-13 10 12 14 28 13 10 11	0	0.037	0
U007	12 14 24 16-17 10 13 13 31 13 10 11	0	0.037	0

U010	15 15 24 14-15 10 13 16 32 13 10 11	0	0.037	0
U012	12 15 24 11-12 10 12 59 29 13 10 11	0	0.037	0
U015	12 14 24 16-18 10 13 13 30 13 10 11	0	0.037	0
U019	10 14 25 12-14 10 13 16 29 13 11 11	0	0.037	0
U021	11 14 25 16-18 10 13 13 30 13 10 11	0	0.037	0
U027	17 60 23 ? 81 13 14 29 12 9 11	0	0.037	0
U033	11 16 22 13-15 10 12 14 28 13 10 11	0	0.037	0
U035	12 15 24 14-15 11 13 17 31 13 10 11	0	0.037	0
U037	13 15 24 14-15 11 13 15 31 13 10 11	0	0.037	0
U042	11 15 23 13-17 10 12 15 28 12 9 11	0	0.037	0
U044	10 14 25 11-15 11 13 59 30 13 11 11	0	0.037	0
U045	10 14 23 11-13 11 13 15 29 14 10 14	0	0.037	0
U047	12 14 24 11-14 10 13 15 29 13 11 11	0	0.037	0
U049	12 14 25 16-18 10 13 13 32 13 10 11	0	0.037	0

U051	11 16 24 14-15 10 13 16 30 13 10 11	0	0.037	0
U054	13 15 24 14-15 11 13 16 33 13 10 11	0	0.037	0
U058	12 15 22 14-16 10 14 14 30 12 9 11	0	0.037	0
U061	12 14 25 12-13 11 13 17 29 13 11 11	0	0.037	0
U063	11 14 25 11-13 10 13 16 29 13 11 11	0	0.037	0
U065	13 15 25 12-15 11 13 16 31 13 10 11	0	0.037	0
U068	11 14 25 11-14 11 13 16 30 13 11 11	0	0.037	0
U-R1	10 14 26 11-15 11 13 16 30 13 11 11	0	0.037	0
U-R2	11 15 24 13-16 10 13 14 29 12 10 11	0	0.037	0
U-R4	13 15 24 14-15 11 13 16 31 13 10 11	0	0.037	0
A12369	12 14 21 18-19 10 13 16 30 15 11 11	0	0	0.04
A12370	12 14 22 16-17 11 13 15 31 13 11 11	0	0	0.04
A12375	11 14 21 16-17 11 13 15 31 13 11 11	0	0	0.04
A12378	11 14 21 16-16 11 14 15 32 13 11 11	0	0	0.04

A12381	12 14 21 15-18 10 13 15 31 13 11 11	0	0	0.04
A12382	12 14 21 16-17 10 14 17 31 14 11 11	0	0	0.04
A12386	11 14 25 14-20 10 12 14 28 13 11 11	0	0	0.04
A12387	13 14 21 17-18 11 13 15 30 13 11 11	0	0	0.04
A12390	14 14 21 16-16.3 11 13 15 30 13 11 11	0	0	0.04
A12392	11 14 24 14-19 11 12 14 28 13 11 11	0	0	0.04
A12395	12 14 21 14-16.3 10 14 15 31 14 11 11	0	0	0.04
A12397	11 14 24 14-16 9 13 15 29 12 10 11	0	0	0.04
A12400	11 14 21 15-17.3 11 13 15 30 13 11 11	0	0	0.04
A12401	12 14 24 11-15 10 14 14 30 13 12 13	0	0	0.04
A12406	13 14 24 13-19 10 13 14 29 13 10 11	0	0	0.04
A12509	11 14 21 16-16.3 11 14 15 32 14 11 11	0	0	0.04
A12510	11 14 21 16-16.3 11 12 15 28 13 11 11	0	0	0.04
A12511	11 14 21 17-17 11 13 15 30 13 11 11	0	0	0.04

A12706	11 14 21 16-17 10 13 15 31 13 11 11	0	0	0.04
A12709	12 14 24 16-16.3 11 13 13 30 13 10 11	0	0	0.04
A12713	11 14 21 16-17 11 13 15 30 13 11 11	0	0	0.04
A12809	11 14 21 17-17 10 13 15 31 12 11 11	0	0	0.04
A12810	12 14 21 15-15 11 12 16 29 14 11 10	0	0	0.04
A12811	11 14 21 17-17 10 13 15 32 13 11 11	0	0	0.04

### **Anexo 3** - Protocolo estandardizado do método extração por *Chelex* [47].

Para a extração de *DNA* através de zaragatoas bucais e de cartões *FTA<sup>TM</sup>* foi seguido o Protocolo estandardizado do método extração por *Chelex*:

- Colocar uma tira de papel *FTA*/um pouco de zaragatoa de cada uma das amostras e colocar em tubos de *eppendorfs* corretamente identificados.
- Adicionar em cada um dos tubos de *eppendorfs* 1ml de água e deixar em repouso 30 minutos à temperatura ambiente.
- Vortexar e colocar a centrifugar 12rpm durante 3 minutos.
- Retirar 970µl de água.
- Adicionar 170µl de *Chelex*.
- Colocar no termobloco à temperatura de 56°C durante 30 minutos e durante esse período colocar o termobloco a agitar.
- Após esse período aumentar a temperatura do termobloco para os 100°C durante 8 minutos.
- Vortexar e colocar a centrifugar 12rpm durante 3 minutos.
- Guardar as amostras a 4°C até amplificar.



#### **Anexo 4** - Protocolo estandardizado para sangue congelado usando o *FavorPrep™ Genomic DNA Mini Kit*.

Para a extração de *DNA* a partir de sangue foi seguido o protocolo estandardizado para sangue congelado usando o *FavorPrep™ Genomic DNA Mini Kit*, dividido em 5 passos:

##### 1. Preparação das amostras:

- Transferir 200µl de sangue para um tubo microcentrifugador de 1.5ml (se o volume da amostra for inferior a 200µl, acrescentar tampão PBS até perfazer o volume).
- Adicionar 30µl de *Proteinase K* (10 mg/ml) e vortexar.
- Incubar a 60°C durante 15 minutos.

##### 2. Lise celular:

- Adicionar 200µl de tampão FABG às amostras e vortexar.
- Incubar a 70°C em “banho-maria” durante 15 minutos. Durante a incubação ir invertendo as amostras a cada 3 minutos.
- Aquecer o tampão de eluição a 70°C em “banho-maria”, para ser utilizado mais à frente.

##### 3. “Binding”:

- Adicionar 200µl de etanol às amostras e vortexar.
- Colocar as colunas FABG em tubos de colheita de 2ml.
- Transferir a mistura da amostra cuidadosamente para as colunas *FABG* e centrifugar a 14rpm durante 5 minutos.
- Colocar as colunas *FABG* em novos tubos de colheita de 2ml.

##### 4. Lavagem:

- Lavar as colunas *FABG* com 400µl de tampão *W1* e centrifugar durante 1 minuto à velocidade de 14rpm e descartar o líquido.
- Colocar as colunas *FABG* em tubos de colheita de 2ml. Voltar a lavar as colunas *FABG* com 600µl de tampão de lavagem. Centrifugar durante 1 minuto à velocidade de 14rpm e descartar o líquido.
- Centrifugar novamente durante 3 minutos à velocidade de 14rpm para secar as colunas.

5. Eluição:

- Colocar as colunas *FABG* em tubos de microcentrifugação de 1.5ml.
- Adicionar 100µl o tampão de eluição (aquecido anteriormente) no centro da membrana das colunas *FABG*. Deixar em repouso durante 3 a 5 minutos para o tampão ser absorvido pela membrana.
- Centrifugar durante 1 minutos à velocidade de 14rpm para eluir o *DNA*.

Após isto temos obtemos um *DNA* puro pronto a ser utilizado. Caso não seja utilizada logo na altura, deve ser armazenado a 4°C ou a -20°C.

**Anexo 5 - STRs autossómicos da amostra populacional Angola (A), n=25.**

	<b>D8S1179</b>	<b>D21S11</b>	<b>D7S820</b>	<b>CSF1PO</b>	<b>D3S1358</b>	<b>TH01</b>	<b>D13S317</b>	<b>D16S539</b>	<b>D2S1338</b>	<b>D19S433</b>	<b>vWA</b>	<b>TPOX</b>	<b>D18S51</b>	<b>AMEL</b>	<b>D5S818</b>	<b>FGA</b>
A12369	14,16	28,34	8,9	10,12	15,16	7,8	11,12	11	16,20	12,13	15	8,9	15,16	X,Y	8,12	22,23
A12370	14,15	28,29	8,11	9,10	15	6,7	11,12	11,12	22,24	11,14	17,19	8,11	15	X,Y	13	24
A12375	12,13	31.2,32.2	8,11	12,13	16	7	12,13	11,13	17,21	14,15	15	6,8	16,20.2	X,Y	11,14	21,25
A12377	13,16	27,30	8,11	12	15,16	7,8	12	11,12	16,20	13,15	16,18	6,9	17,18	X,Y	12	18,22
A12378	12,13	28	8,10	12	16,17	6,8	11,13	11,13	21,24	13,15	14,17	6,8	15,18	X,Y	11,13	24,25
A12381	13,14	30,33.2	8,9	10,11	15	7,8	12	9,12	19,25	14,14.2	15,17	8	17,18	X,Y	12	25,27
A12382	14	28,30	10,12	8,11	15,16	6,7	11	9,11	20,21	12,13.2	16	9,11	15,17	X,Y	11,13	19.2,24
A12386	14	29,31.2	11	10,12	14,16	7,9.3	11,12	9,11	17,24	12.2,13	16,18	10,11	17,20	X,Y	11	23
A12387	12,14	28,31.2	10,11	7,9	16	9,9.3	12,13	12	21,23	13,14	15,19	8,11	13.2,15	X,Y	11	22
A12390	14,15	30,32	12	10	17	8,9	11,12	9,11	20,22	13,14	17,18	8,11	16,17	X,Y	11	20,22
A12392	12,15	29,35	10	10,12	16	6,7	11,12	13	19,22	14,15.2	15	9,11	16	X,Y	8,11	19,21
A12395	13,15	31	10	10	15,17	7	12	8,11	17,24	13,14	15,16	10,11	18,19	X,Y	11,12	28
A12397	14,15	28,31.2	7,8	10,12	15,16	7	10	11,12	19,23	11,13	16,18	8	12,16	X,Y	11,12	22,24
A12400	12,14	30,31	8,11	10,12	17	7,10	11,12	11,12	19,21	11,14	16,19	8,11	15,20.2	X,Y	11,13	19,24
A12401	13,15	30,32.2	10,12	10	17	6,9	11	11,12	23,24	13,14	16,17	8,11	10,12	X,Y	12,13	20
A12406	15,16	29,31.2	7	10,12	15,16	9.3	11,13	11,12	23,24	13,15	16	8	14,16	X,Y	11	19,23
A12509	12,14	28	8,11	7,11	15,17	7,8	10,11	8,11	16,21	12.2,15	18,21	8,12	17,18	X,Y	11,12	19,30
A12510	14,15	28,29	11	10,11	14,16	6	11,12	9,13	21,22	13,14	14,17	9,10	16,20	X,Y	11,12	22,23
A12511	11,15	29,31.2	10,11	11,13	15	7,9	9,13	11	17,23	13,14.2	16	9,11	15,20	X,Y	13,12	22,23

A12706	14,15	28	10,11	10	15,16	8	10,11	11,13	24,25	13,14	16,17	10,11	15,16	X,Y	10,13	18.2,20
A12709	13	28,29	10	9,10	16,17	8,9.3	11,12	11,14	20,25	13,14	15,16	7,8	12,13	X,Y	12,14	22,26
A12713	11,13	31,35	9,11	10,12	16,17	7,9	11	11	21,22	13	17	6,8	15,18	X,Y	13,14	19,25
A12809	13,14	27,30	9,10	10,11	14,16	8	11,12	11,12	16,17	13,14.2	15,19	8	13,16	X,Y	12,13	21,23
A12810	13,15	29,30	8,11	10	15,17	7,8	12,13	5,10	18,22	13,14	16,17	8,9	17,21	X,Y	8,13	18.2,23
A12811	10,16	28,31	10	7,8	14,16	7,8	11,12	10,11	19,21	11,12.2	16,19	8,12	15	X,Y	8,12	24,31.2

**Anexo 6 - STRs autossómicos da amostra populacional Ucrânia (U), n=27.**

	<b>D8S1179</b>	<b>D21S11</b>	<b>D7S820</b>	<b>CSF1PO</b>	<b>D3S1358</b>	<b>TH01</b>	<b>D13S317</b>	<b>D16S539</b>	<b>D2S1338</b>	<b>D19S433</b>	<b>vWA</b>	<b>TPOX</b>	<b>D18S51</b>	<b>AMEL</b>	<b>D5S818</b>	<b>FGA</b>
U001	10,13	30.2,32.2	12	10,12	16,18	6	11,12	9,13	23,25	12.2,15	17,18	8	13,19	X,Y	11,12	21,24
U002	10,11	28,30.2	8	10,12	17,18	6,9	8,11	12,13	25	15,15.2	14,17	8,11	17	X,Y	13	25
U007	10,14	29,33.2	10,11	11	14,18	6,7	11	9,11	17,19	14,15	18	11	16,19	X,Y	10,11	21,22
U010	13,16	30	10,11	10,12	14,18	7	8,13	12	17,19	12,15.2	15,16	11	14,15	X,Y	11,12	19,20
U012	13	31.2,32.2	9,11	9,11	15,18	8,9.3	8,11	11,14	17	15,16	17,19	8	14,18	X,Y	10,12	20
U015	14	31.2,33.2	8,11	11	16,18	8,9	8,11	12,13	20,26	14,16	17	11	16	X,Y	11,12	21
U019	12,15	28,29	9,13	9,10	15	6,9.3	11,14	11,12	16,20	14,15.2	17,18	8,11	17	X,Y	11,12	20,22
U021	13,14	28	8,10	9,11	14,15	7,9.3	10,12	10,11	17,20	15,16.2	18	8	13,16	X,Y	12	15,25
U027	12,13	30,30.2	10	10,11	15,16	8,9.3	11	9,11	20	13,15	14,17	8	14,15	X,Y	10,11	18,21
U033	12,13	30	9,11	10,11	16,17	8,9	8,11	11	17	14,14.2	15,16	10,11	14,16	X,Y	11	21,23
U035	13,14	31,32.2	10,12	10,11	15,16	6,9.3	11,13	12,13	17,18	13	16,18	8,10	16	X,Y	11	22
U037	13,15	29,30	8	10,12	17,18	9,9.3	11	13	17,23	14	17	8,11	12,16	X,Y	12,13	19,25
U042	12,14	28,31.2	9,12	10,11	16,17	6,7	10,11	9	17,23	12,14	15,19	10,11	15,21	X,Y	12	21,22
U044	15	27,28	7,8	12	15,16	7,9.3	10,11	9,12	16,24	14	15,18	11	12,19	X,Y	10,13	20,21
U045	10,16	30	9,10	12	15,18	8,9	10,12	12	17,20	13,15	16,18	8	15	X,Y	12,13	22,24
U047	10,14	29	10	11	15,18	7,9.3	11,12	12,13	22,24	13.2,16.2	15,18	8,9	14,15	X,Y	11,12	20
U049	13,14	28,30.2	10	10,12	15,17	8,9.3	9,13	9	17,23	14,15.2	18,19	8,9	18	X,Y	11,13	21,22
U051	15,16	29,33.2	9,12	10,11	15,16	9.3	11,12	12	16,18	13,14	16,17	8	15,19	X,Y	11,12	19,23
U054	13,14	28,31	10,14	10	15,17	6,9.3	8,9	10,12	24,25	13	18	8,11	13,15	X,Y	11,12	23

U058	11,13	28	8,13	11,12	17,18	9.3	11,12	11,12	17,20	14,14.2	18	8	16,19	X,Y	13,14	24
U061	13	29,32.2	8,10	9,10	14,16	9	11,12	11	17,24	13,14	17,19	8,11	13,17	X,Y	12	20,21
U063	13	28	10,11	10,12	16,17	6,9.3	11,12	11,13	18,19	14,17	17,18	8	14,16	X,Y	11,13	22,24
U065	13,17	28,33.2	10,12	11,12	15,18	9,9.3	11,12	11,12	19,24	13,16.2	16	8	15,20	X,Y	11,13	24
U068	13,14	28,29	9,12	11,13	15,17	9,9.3	11,12	9,11	17,19	13,15	17,18	8	15,17	X,Y	11	22,24
U-R1	13,14	28,3	11,13	10,11	15	6,8	12,13	9,12	15,20	13,15	14,18	8,11	13,14	X,Y	9,10	20,26
U-R2	12,14	30,33.2	8,9	10	15,17	6,9	11,12	10,12	16,23	14,15	17,19	8,10	14	X,Y	10,11	22,26
U-R4	13,14	29,31	9,10	11,12	16	7,9	8,13	12,13	17,20	13,15	18,19	8	13,16	X,Y	11	20,25

**Anexo 7** - Y-STRs da amostra populacional Angola (A), n=25.

	DYS439	DYS437	DYS390	DYS385	DYS391	DYS389-I	DYS19	DYS389-II	DYS393	DYS438	DYS392
A12369	12	14	21	18-19	10	13	16	30	15	11	11
A12370	12	14	22	16-17	11	13	15	31	13	11	11
A12375	11	14	21	16-17	11	13	15	31	13	11	11
A12377	12	14	24	11-14	10	13	14	29	13	12	13
A12378	11	14	21	16-16	11	14	15	32	13	11	11
A12381	12	14	21	15-18	10	13	15	31	13	11	11
A12382	12	14	21	16-17	10	14	17	31	14	11	11
A12386	11	14	25	14-20	10	12	14	28	13	11	11
A12387	13	14	21	17-18	11	13	15	30	13	11	11
A12390	14	14	21	16-16.3	11	13	15	30	13	11	11
A12392	11	14	24	14-19	11	12	14	28	13	11	11
A12395	12	14	21	14-16.3	10	14	15	31	14	11	11
A12397	11	14	24	14-16	9	13	15	29	12	10	11
A12400	11	14	21	15-17.3	11	13	15	30	13	11	11
A12401	12	14	24	11-15	10	14	14	30	13	12	13
A12406	13	14	24	13-19	10	13	14	29	13	10	11
A12509	11	14	21	16-16.3	11	14	15	32	14	11	11
A12510	11	14	21	16-16.3	11	12	15	28	13	11	11
A12511	11	14	21	17-17	11	13	15	30	13	11	11

A12706	11	14	21	16-17	10	13	15	31	13	11	11
A12709	12	14	24	16-16.3	11	13	13	30	13	10	11
A12713	11	14	21	16-17	11	13	15	30	13	11	11
A12809	11	14	21	17-17	10	13	15	31	12	11	11
A12810	12	14	21	15-15	11	12	16	29	14	11	10
A12811	11	14	21	17-17	10	13	15	32	13	11	11

---




**Anexo 8 - Y-STRs da amostra populacional Ucrânia (U), n=27.**

	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	GATA_H4	DYS437	DYS438	DYS448
U001	15	12	25	29	16	16	14-17	13	11	12	21	11	10	15	10	20
U002	14	12	22	28	16	14	12-13	13	10	11	23	11	11	16	10	
U007	15	13	24	31	15	13	16,17	13	10	12	21	11	12	14	10	21
U010	15	13	24	32	17	16	14-15	13	10	15	22	11	11	15	10	20
U012	16	12	24	29	18	14.3	11-12	13	10	12	24	11	11	15	10	20
U015	18	13	24	30	15	13	16-18	13	10	12	25	11	11	14	10	20
U019	14	13	25	29	14	16	12-14	13	10	10	23	11	12	14	11	20
U021	16	13	25	30	17	13	16-18	13	10	11	21	11	11	14	10	20
U027	14	13	23	29	17	14		12	9-10	17	24	11	12	14-15	9	20
U033	14	12	22	28	17	14	13-15	13	10	11	22	11	11	16	10	20
U035	15	13	24	31	17	17	14-15	13	11	12	22	11	11	15	10	20
U037	15	13	24	31	16	15	14-15	13	11	13	24	11	11	15	10	19
U042	12	12	23	28	16	15	13-17	12	10	11	21	11	11	15	9	19
U044	16	13	25	30	18	14.3	11-15	13	11	10	25	11	12	14	11	20
U045	14	13	23	29	18	15	11-13	14	11	10	22	14	12	14	10	17
U047	15	13	24	29	16	15	11-14	13	10	12	23	11	12	14	11	20
U049	16	13	25	32	15	13	16-18	13	10	12	23	11	12	14	10	20
U051	16	13	24	30	17	16	14-15	13	10	11	23	11	11	16	10	20
U054	15	13	24	33	17	16	14-15	13	11	13	24	11	11	15	10	21

U058	15	14	22	30	15	14	14-16	12	10	12	22	11	11	15	9	20
U061	16	13	25	29	15	17	12-13	13	11	12	23	11	13	14	11	20
U063	17	13	25	29	16	16	11-13	13	10	11	23	11	13	14	11	20
U065	15	13	25	31	17	16	12-15	13	11	13	24	11	11	15	10	21
U068	16	13	25	30	16	16	11-14	13	11	11	24	11	13	14	11	20
U-R1	16	13	26	30	15	16	11-15	13	11	10	24	11	13	14	11	20
U-R2	15	13	24	29	22	14	13-16	12	10	11	21	11	11	15	10	19
U-R4	15	13	24	31	16	16	14-15	13	11	13	22	11	11	15	10	20

: alelos nulos.

: alelos ainda não descritos.

: alelos duplicados.

**Anexo 9 - Y-STRs da amostra populacional Porto (P), n=175.**

	DYS456	DYS389I	DYS390	DYS389II	DYS458	DYS19	DYS385	DYS393	DYS391	DYS439	DYS635	DYS392	GATA H4	DYS437	DYS438	DYS448
P001	14	13	24	30	17	15	11-14	14	11	11	23	13	12	15	12	20
P002	15	13	24	29	16	15	11-14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
P003	16	13	25	29	16	14	11-14	12	10	11	23	13	13	15	13	19
P004	15	12	23	28	15	14	14-14	13	11	12	22	12	12	16	10	22
P005	16	13	24	30	19	14	11-15	12	11	13	23	13	11	15	12	19
P006	16	12	24	26	16	15	12-14	13	11	10	24	14	12	15	12	19
P007	14	12	22	27	14	14	12-15	13	10	11	21	11	11	16	10	20
P008	14	12	23	28	15	14	14-15	13	10	11	21	11	11	16	10	20
P009 <sup>1</sup>	17	13	24	29	18	14	11-14	13	11	12	23	13	12	15	11	19
P010	15	13	24	29	16	16	11-15	13	10	11	23	13	12	15	12	21
P011	15	13	25	29	17	14	11-11	13	11	12	23	13	9	15	12	19
P012	15	13	26	32	18	13	15-17.3	13	10	13	21	11	11	14	10	20
P013	15	13	23	30	18	14	13-17	12	10	11	23	11	12	15	9	21
P014	15	12	22	29	19	15	13-16	12	11	11	23	11	11	16	9	21
P015	16	13	23	29	16	14	11-14	13	10	11	25	13	12	14	12	19
P016	15	14	24	30	19	14	11-14	13	11	12	23	13	12	15	12	18
P017	14	14	22	32	14	15	14-20	15	10	11	21	12	12	14	10	20
P018	15	13	26	29	19	14	13-14	12	10	11	22	11	11	15	9	22
P019	15	13	23	30	18	14	11-15	13	11	13	25	13	11	16	12	19

P020	16	13	24	29	15	13	11-14	12	12	12	23	13	12	15	12	19
P021	15	13	24	29	17	14	11-15	13	12	12	23	13	12	14	12	19
P022	14	12	25	28	19	15	15-16	12	10	13	22	11	11	14	9	18
P023	15	13	24	29	17	14	11-13	14	11	12	24	13	12	15	12	19
P024	16	14	23	30	14	15	13-17	12	10	11	22	11	12	14	9	21
P025	14	14	22	31	17	15	13-17	13	10	11	23	12	11	14	10	20
P026	16	15	21	32	19	15	14-16.3	14	10	11	21	12	11	14	11	21
P027	16	13	24	29	16	14	11-15	12	11	12	24	13	12	15	12	20
P028	15	14	24	30	16	15	11-14	13	11	13	24	13	12	15	12	19
P029	15	14	24	31	19	13	16-16	12	10	13	24	11	13	14	11	20
P030	16	14	24	30	17	14	11-14	12	11	11	23	13	12	15	12	19
P031	16	13	24	29	18	13	12-14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
P032	15	13	24	29	17	14	11-13	14	11	12	23	13	12	15	13	19
P033	15	13	25	31	20	16	12-15	14	10	13	21	12	11	15	10	20
P034	16	13	25	30	16	14	11-14	12	10	11	23	13	13	15	13	19
P035	16	14	24	30	19	13	13-15	13	9	10	21	11	12	14	10	20
P036	15	12	22	29	19	15	13-16	12	10	13	22	10	11	16	9	21
P037	16	13	24	29	14	15	13-16	12	9	11	22	11	12	14	9	20
P038 <sup>1</sup>	15	13	23	27	17	14	11-15	13	11	11	23	13	12	15	12	19
P039	16	14	25	31	19	13	13-14	13	9	10	21	11	12	14	10	21
P040	14	13	24	31	18	14	14-19	13	11	14	21	11	12	14	10	20
P041	16	12	21	29	16	16	14-19	14	11	12	23	11	11	16	10	22

P042	16	13	24	29	17	14	12-15	14	11	13	23	13	13	15	12	19
P043	15	13	23	28	16	16	12-12	13	10	11	21	11	12	15	10	21
P044	18	12	23	28	16	15	14-15	14	10	12	21	11	13	16	10	21
P045	15	13	24	30	16	14	12-15	14	11	13	23	13	12	15	10	20
P046	16	14	24	29	16	15	11-15	13	11	11	23	13	12	15	12	17
P047	16	14	24	30	18	13	13-15	13	9	10	21	11	12	14	10	20
P048	15	13	24	28	17	15	11-14	13	11	12	24	13	12	15	12	19
P049	14	13	23	28	17	17	12-12	14	10	11	22	11	12	15	10	21
P050	16	12	24	28	14	15	13-16	12	9	12	22	11	12	14	9	20
P051	15	13	25	29	17	14	11-12	13	11	12	23	13	12	14	12	19
P052	15	12	23	29	18	14	12-13	13	11	13	25	11	11	14	10	21
P053	14	12	23	28	17.	14	13-14	13	10	11	21	11	11	16	10	20
P054	15	14	24	30	17	14	11-14	13	11	11	23	13	11	14	12	19
P055	16	13	24	29	17	14	11-14	13	10	12	24	13	12	14	12	19
P056 <sup>1</sup>	15	13	24	29	18	14	11-14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
P057	16	13	24	29	12	15	11-15	13	11	12	23	13	12	15	12	19
P058	17	13	24	29	17	14	11-14	14	10	12	23	13	12	15	12	19
P059	16	13	25	29	15	14	11-14	13	10	11	23	13	12	15	12	18
P060	16	13	24	30	15	13	15-16	13	11	12	21	11	13	14	10	20
P061	16	13	24	29	18	14	11-15	13	11	12	23	12	11	14	12	18
P062	15	13	23	29	16	14	11-14	13	10	11	23	14	12	15	12	18
P063	13	13	23	27	16	17	12-12	13	10	11	22	11	12	15	10	21

P064	17	13	24	29	16	14	11-14	13	11	12	24	13	12	15	12	19
P065	14	13	24	30	18	14	12-14	13	11	11	23	13	12	16	12	18
P066	15	13	24	29	18	15	11-14	13	11	11	23	13	11	15	12	19
P067	16	14	24	29	16	15	13-15	13	10	12	23	13	12	15	11	19
P068	17	13	24	29	16	14	12-12	13	10	22	23	13	12	15	12	19
P069	14	14	24	30	17	14	12-15	13	11	12	23	13	11	14	12	18
P070	15	13	22	29	20	14	13-19	13	10	13	21	11	11	14	10	21
P071	15	13	24	29	19	14	11-14	13	10	12	24	13	12	15	12	19
P072	15	13	22	29	19	14	13-19	13	10	13	21	11	11	14	10	21
P073	16	13	24	30	18	14	11-15	13	11	11	25	13	12	15	12	19
P074	15	12	22	28	15	15	13-14	13	10	11	22	11	11	15	10	19
P075	15	13	24	29	18	14	11-15	13	10	12	23	13	12	15	12	19
P076	16	12	24	30	14	13	16-18	13	10	10	22	11	11	14	11	20
P077	15	13	24	29	17	14	11-15	13	10	12	23	13	11	14	12	19
P078	16	13	24	29	18	14	11-11	13	11	11	23	13	11	14	12	18
P079	15	13	24	31	15	15	13-18	12	10	11	22	11	10	14	10	19
P080	16	13	24	29	17	14	11-14	13	11	13	23	12	12	15	12	19
P081	15	12	22	30	17	15	14-15	14	10	11	21	11	11	15	10	21
P082	13	12	25	28	15	16	13-17	12	10	11	21	11	11	16	9	19
P083	16	14	24	30	18	14	12-14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
P084	16	14	24	30	18	14	11-14	13	11	12	23	13	12	15	12	18
P085	16	13	24	29	18	15	11-14	13	12	13	23	13	12	15	12	19

P086	15	13	22	31	16	14	13-15	12	10	11	24	11	10	15	9	22
P087	14	12	22	28	15	15	13-14	13	10	12	20	11	11	16	10	20
P088	15	13	23	30	19	14	13-15	12	10	11	20	11	11	14	10	20
P089	16	13	23	29	14	15	13-16	12	9	12	21	11	12	14	9	21
P090	18	14	24	31	15	13	15-18	13	10	13	23	11	12	14	10	20
P091	17	13	23	29	17	14	11-13	13	10	12	23	13	12	17	12	19
P092	15	13	24	29	17	14	11-14	13	11	12	23	13	13	15	12	19
P093	15	13	24	29	18	14	11-12	13	10	12	23	13	12	15	12	19
P094	14	13	25	29	16	14	11-14	13	11	12	24	12	12	15	12	19
P095	15	13	24	29	18	14	11-14	13	10	12	23	13	12	15	12	19
P096	16	13	24	28	18	14	11-14	13	10	12	23	13	12	15	12	19
P097	17	13	24	30	15	12	16-16	12	10	12	23	11	12	14	10	21
P098	16	14	25	30	16	13	13-14	13	9	10	20	11	12	14	10	20
P099	14	13	25	29	16	14	11-14	13	11	11	23	14	12	16	12	19
P100	15	13	22	29	18	16	14-16	12	11	12	24	11	11	15	9	21
P101	15	13	24	29	17	15	11-14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
P102	15	13	24	30	19	14	11-15	13	11	11	24	13	12	15	11	19
P103	14	13	23	28	17	16	12-12	13	10	12	21	11	12	14	10	21
P104	15	12	22	29	17	15	14-15	14	10	12	21	11	12	16	10	21
P105	16	13	24	30	17	17	12-17	13	11	11	21	11	11	14	10	20
P106	17	14	24	30	17	14	11-14	14	11	11	23	13	11	14	12	19
P107	14	12	23	28	15	15	13-17	13	10	11	21	11	11	16	10	20

P108	15	13	24	30	17	15	11-14	15	11	12	23	13	12	15	12	20
P109	15	14	24	31	14	13	15-18	13	10	12	24	11	12	14	10	20
P110	15	12	25	28	16	15	14-16	13	10	11	21	14	11	14	9	19
P111	16	13	24	29	16	14	11-15	13	11	12	23	13	12	14	12	19
P112	15	13	24	29	16	14	11-13	13	11	12	23	13	12	15	12	19
P113	15	13	24	29	17	15	11-12	13	11	12	23	13	9	15	12	19
P114	16	13	24	29	18	15	14-15	13	10	12	23	13	12	15	12	19
P115	15	14	23	31	19	14	13-15	12	10	11	20	11	11	14	10	20
P116	15	13	24	29	18	14	11-15	13	11	12	23	13	12	15	12	19
P117	15	11	22	27	16	16	14-16	14	10	11	21	12	13	16	11	21
P118	15	13	25	29	18	14	14-17	12	10	11	21	11	11	14	10	20
P119	16	13	24	29	16	15	11-14	13	11	12	23	14	12	15	12	19
P120	17	13	23	30	16	13	16-16.3	13	10	12	21	11	13	14	10	20
P121	15	13	24	29	19	14	11-11	13	11	12	23	13	12	15	12	18
P122	17	13	23	29	17	14	11-14	13	10	12	25	13	12	15	13	19
P123	16	13	24	29	16	15	10-14	13	10	12	23	13	12	15	12	19
P124	15	13	24	29	17	14	12-15	13	10	13	23	13	13	14	12	18
P125	15	13	22	31	19	14	14-18	12	10	12	20	11	11	14	10	20
P126	16	13	24	29	18	14	11-14	13	11	12	24	13	12	14	9	18
P127	14	13	23	30	19	14	12-20	12	10	13	21	11	12	14	10	20
P128	17	13	23	29	17	15	12-14	13	10	13	24	13	12	15	12	19
P129	15	12	22	28	15	14	13-14	13	10	11	21	11	11	16	10	20



P130 <sup>1</sup>	18	13	23	30	17	15	13-15	12	11	11	21	11	12	14	9	20
P131	15	13	24	29	16	14	11-14	12	10	12	23	13	12	15	12	20
P132	15	13	24	29	16	14	12-14	12	10	12	23	13	12	15	12	20
P133	15	14	25	30	18	13	14-14	13	9	10	21	11	12	14	10	20
P134	15	12	21	28	15	16	14-19	14	11	11	23	11	11	16	10	22
P135	15	14	23	29	17	14	14-16.3	13	10	12	21	13	10	14	9	20
P136	16	13	22	29	16	14	13-16	12	10	12	24	11	11	14	8	21
P137	15	13	23	29	17	14	13-17	12	10	11	22	12	12	15	9	21
P138	17	13	23	29	17	14	11-14	13	11	12	24	13	12	15	13	19
P139	15	13	24	29	17	14	11-12	13	12	13	23	13	12	14	12	19
P140	16	13	24	29	17	13	11-14	13	11	12	23	14	11	14	12	19
P141	16	13	24	28	17	14	11-15	14	10	12	23	13	12	15	12	19
P142	15	13	24	30	17	13	15-18	13	10	13	22	11	11	14	10	20
P143	15	14	24	30	17	14	11-14	13	10	12	23	13	11	15	12	19
P144	17	13	24	31	16	14	11-14	14	11	12	23	13	12	15	12	19
P145	16	12	24	30	18	13	15-17	13	10	12	23	11	11	14	10	19
P146	16	12	24	28	18	13	11-14	13	11	12	23	14	11	14	12	19
P147	15	13	22	29	16	14	13-17	12	9	11	24	11	11	15	9	21
P148	17	13	24	29	18	14	11-14	13	11	11	24	13	12	15	12	19
P149	15	14	24	30	17	14	11-13	14	10	11	23	13	12	15	12	19
P150	16	12	26	28	20	14	11-14	14	10	12	23	13	11	15	12	19
P151	16	12	24	28	17	14	11-15	13	10	13	23	13	11	14	12	18

P152	16	12	24	28	17	14	11-15	13	10	13	23	13	11	14	12	19
P153	15	14	24	30	18	14	11-14	13	11	12	23	13	11	15	11	19
P154	17	13	24	30	17	15	11-13	13	11	12	23	13	12	14	12	18
P155	17	14	24	30	19	14	11-13	14	11	12	24	13	12	15	12	19
P156	15	13	23	30	20	14	15-15	13	10	12	21	11	11	14	10	20
P157	16	12	21	29	15	16	13-14	15	10	11	23	11	11	16	10	23
P158	15	12	21	29	15	16	13-14	15	10	11	23	11	11	16	10	23
P159	15	13	24	29	18	14	11-14	13	11	12	25	13	12	15	12	19
P160	15	13	27	32	18	13	15-17.3	13	10	12	21	11	11	14	10	20
P161	15	13	23	29	17	14	11-14	12	11	11	23	13	13	15	12	19
P162	16	13	24	30	15	13	15-18	13	10	11	25	11	12	14	10	20
P163	16	13	26	29	17	14	11-14	13	10	11	23	13	12	15	12	19
P164	15	13	23	29	16	14	11-14	13	11	12	23	13	12	15	12	19
P165	17	13	24	31	18	13	16-17	13	10	12	22	11	11	14	10	20
P166	15	13	24	29	17	14	11-14	13	10	13	23	13	12	15	12	19
P167	16	14	23	32	18	14	14-16	13	10	11	21	13	12	14	9	18
P168	15	13	24	29	19	14	11-14	12	10	12	23	13	11	15	12	19
P169	16	13	24	30	17	15	11-15	13	11	12	23	13	12	15	12	19
P170	15	13	25	29	17	14	11-14	12	11	12	23	13	13	15	12	19
P171	16	14	24	31	17	15	11-14	13	10	13	23	13	12	15	12	19

1: Amostra corresponde a dois indivíduos.

